

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MARCOS ANDRÉ SOARES LEAL

**Efeito do Sildenafil na Função Endotelial de Camundongos Ateroscleróticos**

VITÓRIA

2015

## **Efeito do Sildenafil na Função Endotelial de Camundongos Ateroscleróticos**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.  
Orientador: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez  
Co-orientadora: Profa. Dra. Camille de Moura Balarini

VITÓRIA

2015

MARCOS ANDRÉ SOARES LEAL

**Efeito do Sildenafil na Função Endotelial de Camundongos Ateroscleróticos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Prof.Dr. Thiago de Melo Costa Pereira

Universidade Vila Velha (UVV)

Membro externo

---

Prof.Dr. Jones Bernardes Graceli

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Membro interno

---

Prof.Dr. Elisardo Corral Vasquez

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Orientador

---

Prof.Dr. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Coordenadora PPGCF-UFES

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Marcos Andre Soares Leal

Efeitos do sildenafil na função endotelial de camundongos  
ateroscleróticos / Marcos Andre Soares Leal. – Vitória, UFES /  
PPGCF, 2015.

112f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) –  
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da  
Saúde, maio de 2015.

Orientação: Prof. Dr. Elisardo Corral Vasquez.

Co-orientação: Prof. Dra. Camille de Moura Balarini.

1. Aterosclerose. 2. Disfunção Endotelial. 3. Reatividade  
Vascular. 4. Aneis de aorta - Dissertação. I. Vasquez, Elisardo  
Corral, Nome. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro  
de Ciências da Saúde. III. Título

CDU: 612

---

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus! Sem ele, jamais teria chegado até aqui! Há um grande caminho pela frente ainda, mas sei que ele estará me guiando, ajudando, e dando força nessa jornada .

Aos meus pais, Guaracy Soares Leal e João Leal, e irmãs Suzana, e Jemina, que sempre estiveram ao meu lado. Obrigado pelo apoio em todos os momentos da vida!

Ao meu orientador, Professor Dr. Elisardo Corral Vasquez, que me acolheu de braços abertos, me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e maestria, sempre me orientando, e dedicando parte do seu tempo a mim. Obrigado Professor!

À Professora Dra. Silvana dos Santos Meyrelles, pelo incentivo à pesquisa, orientações, bom humor, e disponibilidade sempre quando foi necessário.

À Professora Dra. Ágata Lages Gava, pelos ensinamentos, e por tornar agradáveis todos os locais por onde passa.

À Professora Dra. Camille Balarini, por me ensinar os protocolos, e por todo aprendizado ao longo desses anos no laboratório, muito obrigado.

Ao Professor Dr. Thiago de Melo, pelo conhecimento compartilhado, pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho, e pela amizade.

A todos os amigos, e companheiros do laboratório de Fisiologia Translacional: Ananda, Bianca Rodrigues, Thiago Menezes, Marcella, Laís, Alan, Fran, Brunella, Thaís, Jamilla, Rossana, Geisiane.

## RESUMO

Vimos anteriormente que o sildenafil restaura o relaxamento dependente do endotélio em aortas de animais ateroscleróticos apolipoprotein E knockout (apoE). No presente estudo, testamos a hipótese que a disfunção endotelial também é caracterizada por hiper-reatividade à fenilefrina (FE), e que o sildenafil pode reparar esta anormalidade neste modelo experimental. Anéis de aorta de camundongos apoE tratados com sildenafil (apoE-sil, 40 mg/kg/dia) foram avaliados e comparados com apoE-veí e controle (CT) os quais receberam apenas veículo. O grupo apoE-veí exibiu um desbalanço entre os níveis de Óxido Nítrico (NO) e Espécies Reativas de Óxigênio (NO/ERO's) e um aumento na resposta máxima (Rmax, 20%) e sensibilidade (7%) à FE, os quais não foram modificados após retirada do endotélio. Após o bloqueio com indometacina a resposta máxima diminuiu significativamente no grupo apoE-veí (37%), no grupo CT (27%), e no grupo apoE-sil (30%). Em seguida, bloqueamos a NADPH Oxidase, e a resposta máxima diminuiu significativamente no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo (- 33%), enquanto nos demais grupos não foi observada diferença. O sildenafil reduziu as lesões ateroscleróticas e o desbalanço (NO/ERO's) nos camundongos apoE (40%). Concluímos portanto, que a disfunção endotelial no camundongos apoE-veí foi caracterizada por diminuição na biodisponibilidade de NO, e aumento da resposta contrátil à FE, devido ao estresse oxidativo e tromboxano A2, e o sildenafil corrigiu esta anormalidade. Os efeitos benéficos deste inibidor da fosfodiesterase-5 na disfunção endotelial e deposição lipídica o levam a ser uma interessante ferramenta para o tratamento da aterosclerose.

Palavras-chave: Aterosclerose. Camundongos ApoE Knockout. Sildenafil. Óxido nítrico. Estresse oxidativo. Disfunção endotelial. Fosfodiesterase 5. GMP cíclico.

## **ABSTRACT**

In previous studies we have shown that sildenafil ameliorates aortic relaxations in apolipoprotein E knockout (apoE) mice. Now, we tested the hypothesis that endothelial dysfunction (ED) in this model is characterized by contractile hyperresponsiveness to phenylephrine (PE) and that this abnormality could be repaired by the treatment with sildenafil. The aortic rings were evaluated in apoE mice treated with sildenafil (apoE-sil, 40 mg/kg/day) and compared with apoE and wild-type (WT) mice administered with vehicle (veh). The apoE-veh mice exhibited an imbalance of nitric oxide and reactive oxygen species (NO/ROS) levels and an increased maximum response ( $R_{max}$ , 20%) and sensitivity (7%) to PE, which were not modified by endothelial removal. Under the prostanoids blockade, vasocontraction was decreased more in apoE-veh (-37%) than in WT (-27%) and apoE-sil (-30%) mice. NADPH-oxidase blockade abolished the enhanced contractile responsiveness in apoE-veh (-33%), without effects in WT and apoE-sil groups. The atherosclerotic lesions and the imbalance of NO/ROS were reduced (40%) in apoE-sil mice. In conclusion, ED in apoE mice was characterized by decreased NO-bioavailability and contractile hyperresponsiveness, due to thromboxane and oxidative stress, and was normalized by sildenafil. The beneficial effects of this phosphodiesterase-5 inhibitor on ED and lipid deposition provide new insights for its use as adjuvant in the treatment of atherosclerosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxa de internação hospitalar.....	18
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de regulação da atividade da eNOS.....	21
<b>Figura 3.</b> O metabolismo das lipoproteínas.....	25
<b>Figura 4.</b> Panorama geral da aterosclerose.....	28
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de ação do sildenafil.....	36
<b>Figure 6.</b> Efeito do tratamento com sildenafil na vasoconstrição em camundongos ApoE <sup>-/-</sup> .....	55
<b>Figure 7.</b> Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta e o efeito do tratamento com sildenafil em animais ApoE <sup>-/-</sup> .....	57
<b>Figure 8.</b> Contribuição dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina e o efeito do tratamento com sildenafil em animais apoE <sup>-/-</sup> .....	59
<b>Figure 9.</b> Contribuição do estresse oxidativo na resposta contrátil à fenilefrina e o efeito do tratamento com sildenafil em animais apoE <sup>-/-</sup> .....	61
<b>Figure 10.</b> Marcadores de estresse oxidativo no plasma de camundongos controle C57, apoE <sup>-/-</sup> veículo, e apoE <sup>-/-</sup> tratado com sildenafil.....	63
<b>Figure 11.</b> Efeito do sildenafil na deposição lipídica vascular.....	64



## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> perfil lipídico plasmático de animais controle (CT), apoE <sup>-/-</sup> veículo e apoE <sup>-/-</sup> tratados com sildenafil. ....	53
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidônico

AC: Adenilato ciclase

ACh: Acetilcolina

ADMA: Dimetilarginina assimétrica

ANOVA: Análise de Variância

ApoE: Apolipoproteína E

ApoE<sup>-/-</sup>: Camundongo deficiente em apolipoproteína E

BH4: 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

CETP: Proteína de transferência de colesterol esterificado

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

cGMP: Guanosina monofosfato cíclico

CMLV: Células Musculares Lisas Vasculares

COX: Ciclooxigenase

CT: Animais controle da linhagem C57BL/6

CTNBIO: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DATASUS: Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

dAUC: Diferença entre as áreas abaixo da curva

DCV: Doenças cardiovasculares

DDAH: Di-metil arginina dimetil-amino hidrolase

DHE: Dihidroetídio

EMESCAM: Escola de Superior da Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

FE: Fenilefrina

GC: Guanilato cicase

GTP: Guanosina trifosfato

HDL: Lipoproteína de alta densidade

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular

IDL: Lipoproteína de densidade intermediária

IFN $\gamma$ : Interferon gamma

IL-6: Interleucina

L-arg: L-arginina

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LLP: Lipase Lipoproteica

L-NAME: N-G-nitro-L-arginina metil ester

log EC<sub>50</sub>: Log da dose de agonista que produziu metade da resposta máxima

MDA: Malondialdeído

MS: Ministério da Saúde

MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NIH: National Institute of Health

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

•O<sub>2</sub> - : ânion superóxido

ONOO<sup>-</sup> : Peroxinitrito

oxLDL: LDL oxidado

PBS: Tampão fosfato salino

PDE: fosfodiesterase

PDE5: fosfodiesterase 5

pEC<sub>50</sub>: -logEC<sub>50</sub>

PGD<sub>2</sub>: Prostaglandina D

PGDS: Prostaglandina D Sintase

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E2

PGES: Prostaglandina Sintase

PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandina F<sub>2α</sub>

PGFS: Prostaglandina F Sintase

PGI<sub>2</sub>: Prostaglandina I<sub>2</sub>/Prostaciclina

PGIS: Prostaciclina Sintase

PGH<sub>2</sub>: Prostaglandina H<sub>2</sub>

PK: Proteínas kinase

PKG: Proteína kinase G

PP-1: Fosfatase-1

QM: quilomícrons

R<sub>máx</sub>: Resposta máxima

SBC: Sociedade Brasileira de Cardiologia

sGC: Guanilato ciclase solúvel

SOD: Superóxido dismutase

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TXA<sub>2</sub>: Tromboxano A<sub>2</sub>

TXS: Tromboxano Sintase

TNFα: Fator de necrose tumoral alfa

VCAM-1: Molécula de Adesão Celular Vascular

VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade

WHO: World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 Epidemiologia .....	18
1.2 Endotélio vascular e óxido nítrico.....	20
1.3 Aspectos gerais do metabolismo lipídico.....	23
1.4 Camundongo apoe knockout (apoe KO) como modelo para o ser humano....	26
1.5 Aterosclerose.....	27
1.6 Estresse oxidativo.....	31
1.7 Via da Ciclooxygenase (COX) .....	33
1.8 Fosfodiesterases e Sildenafil .....	35
 <b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	 <b>39</b>
 <b>3. OBJETIVOS</b>	
3.1 Objetivos Gerais .....	42
3.2 Objetivos específicos .....	42
 <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
4.1 Animais experimentais .....	44
4.2 Grupos experimentais .....	44
;	
4.3 Avaliação da função vascular.....	45
4.3.1 Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio.....	46
4.3.2 Avaliação de reatividade vascular à fenilefrina.....	47

4.3.3 Participação do Endotélio na Reatividade Vascular à Fenilefrina.....	47
4.3.4 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à Fenilefrina.....	47
4.3.5 Participação dos Prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à Fenilefrina.....	48
4.4 Quantificação da lesão aterosclerótica.....	48
4.5 Dosagem de colesterol.....	49
4. 6 Avaliar o efeito do tratamento sobre os níveis de peroxidação lipídica e oxidação proteica.....	49
5. Estatística.....	51

## **6. RESULTADOS**

6.1 Perfil lipídico plasmático .....	53
6.2 Reatividade Vascular à fenilefrina .....	53
6.3 Participação do Endotélio na Reatividade Vascular à Fenilefrina.....	56
5.4 Participação dos Prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a Fenilefrina.....	58
6.5 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil a Fenilefrina .....	60
6.5 Marcadores de estresse oxidativo no plasma.....	62
6.6 Efeitos do sildenafil na deposição lipídica vascular.....	63
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>







## **INTRODUÇÃO**

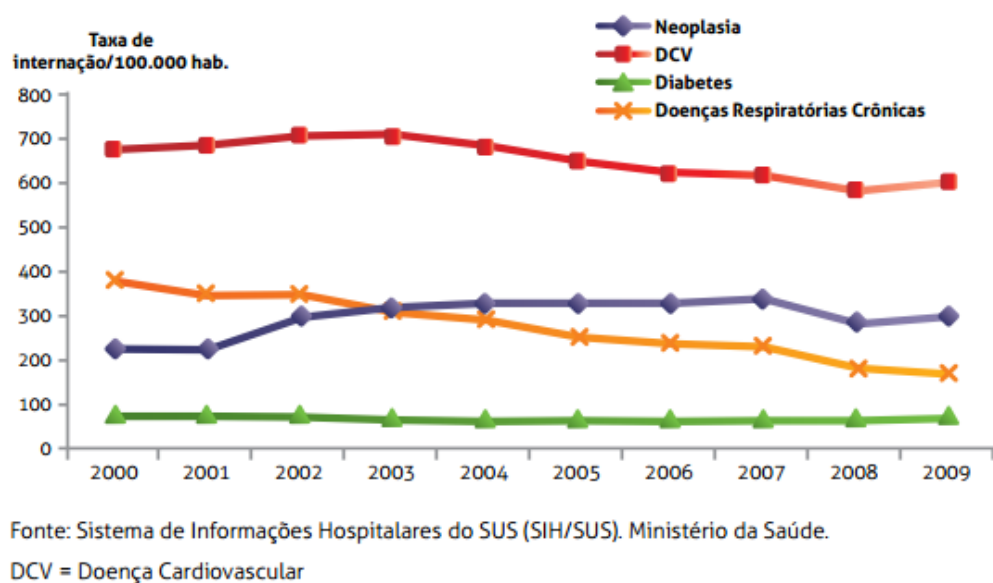
## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Epidemiologia**

No ano de 2005, 61% das 58 milhões de mortes ocorridas em todo o mundo foram devido a doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), principalmente as doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas. Já em 2008, as DCNT's foram responsáveis por 36 milhões dos 57 milhões de óbitos. A maior parte de mortes pelas DCNT's (quase 80%) ocorre em países de baixa e média renda e são as causas mais freqüentes de morte em todo o mundo, exceto na África. Mesmo em nações africanas as DCNT's crescem rapidamente, e acredita-se que irão ultrapassar as doenças transmissíveis, maternas e nutricionais, como causas mais comuns de morte em 2030 (WHO, 2011; Saúde Brasil, 2010).

No Brasil, as DCNT's compreenderam 66,6% de todos os óbitos ocorridos em 2009. No mesmo ano as doenças cardiovasculares foram responsáveis pelo maior número de óbitos, correspondendo a 31,3% do total. Sendo que as quatro principais doenças (cardiovasculares, diabetes, neoplasias e respiratórias) foram responsáveis por 80,7% dos óbitos por doenças crônicas (Saúde Brasil, 2010). Fica evidente que as doenças do aparelho circulatório são responsáveis por grande parte da morbi-mortalidade, com um significativo impacto nos gastos em saúde, principalmente na atenção de alta complexidade.

No Brasil, dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) mostram que a causa cardiovascular corresponde a perto de 30% das causas de morte. Para ser ter uma ideia, ocorreram, no Brasil, mais de 80 mil internações apenas no mês de fevereiro de 2014 por doenças do sistema circulatório gerando um enorme custo para o Sistema Único de Saúde (SUS), visto que as doenças do aparelho circulatório são as principais causas de internação (Saúde Brasil, 2010) como pode ser visto na figura 1.



**Figura 1:** Taxa de internação hospitalar. DCV: Doenças cardiovasculares. (Fonte: Ministério da Saúde, 2011).

Dentre as várias doenças cardiovasculares, destaca-se a aterosclerose que é definida como uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente artérias de médio e grande calibre. Ocorrem alterações da camada íntima, representadas por acúmulo de lipídeos, carboidratos complexos, componentes do sangue, células e material intercelular (Ross, 1993). Esta pode ser

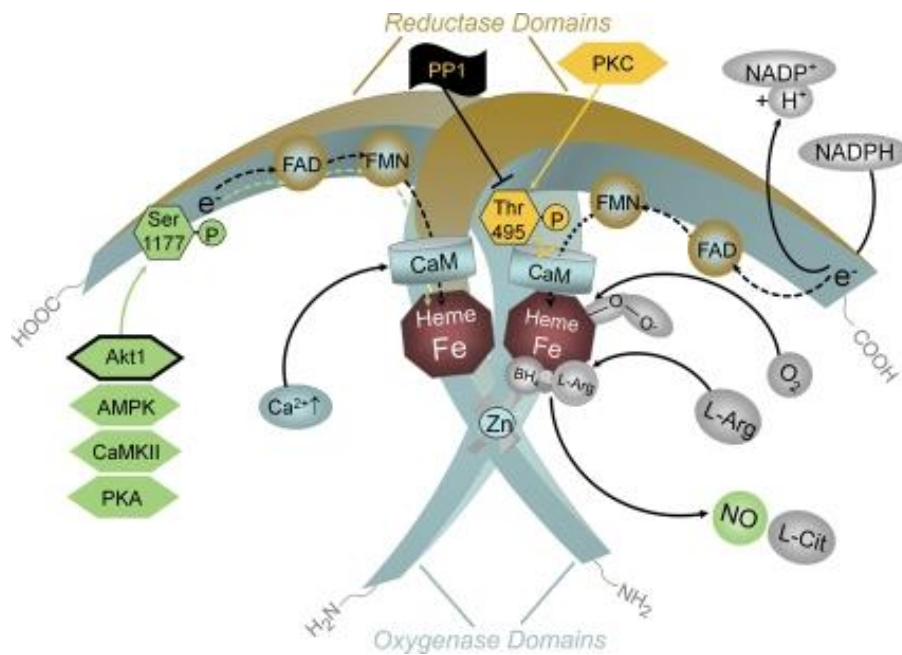
desencadeada por fatores de risco cardiovascular, como hipercolesterolemia, idade, hipertensão e diabetes *mellitus* (Filho & Zilberstein, 2000).

## **1.2 Endotélio Vascular e Óxido nítrico**

O endotélio vascular é formado por uma camada de células localizada na interface entre o sangue e o músculo liso vascular. Encontra-se localizado estrategicamente na parede vascular e assim ele pode: atuar como sensor de alterações hemodinâmicas; transmitir sinais celulares e da matriz extracelular; produzir mediadores que interferem com crescimento, atividade, migração e morte celular; manter as alterações adaptativas para a adequação às necessidades circulatórias (Carvalho et al., 2001). Além disso, as células endoteliais são responsáveis pela liberação de fatores contráteis e relaxantes (Vanhoutte et al., 2009).

Dentre as várias substâncias produzidas pelo endotélio, a que tem recebido grande atenção de pesquisadores, é o Óxido Nítrico (NO). A produção de NO é ativada por estimulação de receptores de superfície, tais como acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato (ADP), substância P, ou por força mecânica, como o shear stress (D'uscio et al., 2001; Vanhoutte et al., 2009). O NO é sintetizado por ação da sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) pela conversão de L-arginina a L-citrulina e NO, necessitando de oxigênio, NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato), FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo), FMN (Flavina Mononucleotídeo) e BH4 (Tetrahidrobiopterina) (Meyrelles et al., 2011).

A eNOS é expressa principalmente pelas células endoteliais, no entanto, isoenzimas também tem sido detectadas em miócitos cardíacos, plaquetas, neurônios cerebrais, sinciciotrofblastos de placenta humana, e células epiteliais do túbulo renal. A ativação da eNOS pode ser regulada por aumento de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular, e por fosforilação em sítios específicos. O aumento de ( $\text{Ca}^{2+}$ ) promove um aumento da ligação da calmodulina à enzima, que por sua vez facilita o fluxo de elétrons derivados do NADPH do domínio redutase para o domínio heme oxigenase da enzima. Fosforilações da enzima em sítios específicos também tem sido bem estabelecidas na eNOS humana. Os principais sítios são dos aminoácidos serina 1177 (Ser1177), e treonina 495 (Thr495). Em células endoteliais no estado basal, a Ser1177 da eNOS não se encontra fosforilada. A fosforilação pode ser induzida por estrógenos, (VEGF) insulina, bradicinina, ou *shear stress*. Estrógenos e VEGF induzem fosforilação em Ser1177, via Akt, insulina por Akt e Proteína Kinase Ativada por AMP (AMPK), bradicinina por proteína kinase II dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulina, e o *shear stress* principalmente via proteína Kinase A. A fosforilação do resíduo Ser1177 aumenta o fluxo de elétrons através do domínio redutase, e consequentemente aumenta a atividade da enzima. O resíduo Thr495 é um sítio de regulação negativa, que ao ser fosforilado, reduz o fluxo de elétrons, e consequentemente a atividade da enzima. A principal enzima que fosforila a eNOS em Thr495 é a proteína kinase C. A fosfatase que defosforila este sítio é a fosfatase-1 (PP-1) (Förstermann & Sessa, 2012).



**Figura 2.** Mecanismos de regulação da atividade da eNOS Förstermann & Sessa, 2012.

Uma vez produzido, o NO difunde-se rapidamente para o músculo liso vascular e para o lúmen vascular e, ao penetrar para o interior da célula muscular lisa, estimula a guanilato ciclase solúvel, promovendo assim um aumento de  $\text{GMP}_C$ , o qual estimula a saída de cálcio da célula muscular lisa, com consequente vasodilatação (Filho & Zilberstein, 2000).

Além disso, o NO controla genes envolvidos na aterogênese. O óxido nítrico diminui a expressão da proteína quimioatática de monócitos-1 (MCP-1), e inibe a adesão de leucócitos na parede do vaso, por suprimir a expressão superficial de CD11\CD18 em leucócitos. O óxido nítrico também previne a apoptose de células endoteliais, que podem ser induzidas por citocinas pró-inflamatórias, e por fatores que induzem a aterosclerose, incluindo espécies reativas de oxigênio, e angiotensina II. Logo, a supressão do processo apoptótico, pode

contribuir para a atividade antiinflamatória, e ateroprotetora do NO (Förstermann & Sessa, 2012).

Além do mais, tem sido relatado que o NO inibe a síntese de DNA, mitogênese, e proliferação de células musculares lisas vasculares, e tais efeitos antiproliferativos são mediados pelo GMPc (Förstermann & Sessa, 2012).

### **1.3 Aspectos gerais do metabolismo lipídico**

Do ponto de vista fisiológico e clínico, os lipídeos biologicamente mais relevantes são os fosfolípidos, o colesterol, os triglicérides (TG) e os ácidos graxos. Os fosfolípidos formam a estrutura básica das membranas celulares. O colesterol é precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares e da vitamina D. Além disso, como constituinte das membranas celulares, o colesterol atua na fluidez destas e na ativação de enzimas aí situadas. Os triglicérides são formados a partir de três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol e constituem uma das formas de armazenamento energético mais importante no organismo, depositados nos tecidos adiposo e muscular (SBC, 2007).

As lipoproteínas permitem a solubilização e transporte dos lipídeos, que são substâncias geralmente hidrofóbicas, no meio aquoso plasmático. São compostas por lipídeos e proteínas denominadas apolipoproteínas (apos). As *apos* têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas como a formação intracelular das partículas lipoprotéicas, caso das apos B100 e B48, ligantes a



receptores de membrana como as apolipoproteínas B100 e E, ou cofatores enzimáticos, como as apolipoproteínas CII, CIII e AI (SBC, 2007).

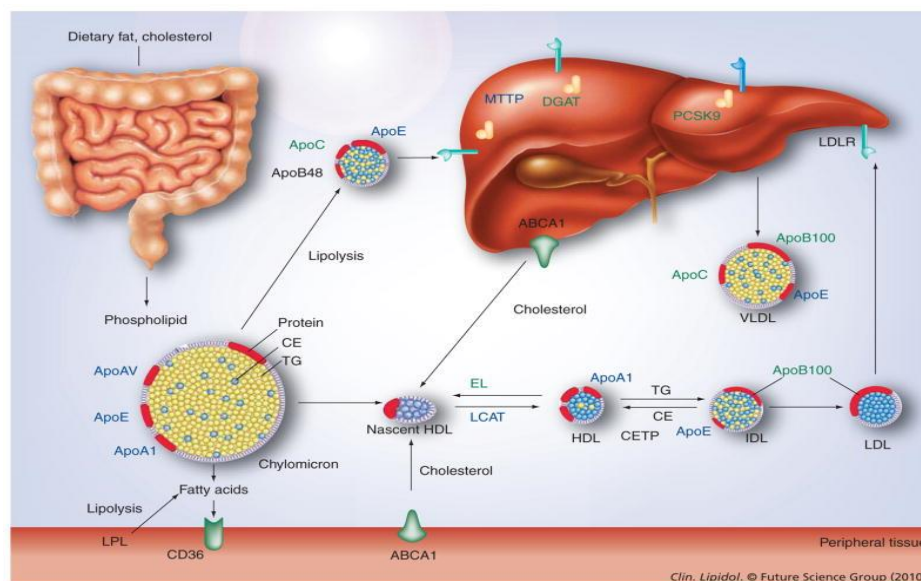
As classes de lipoproteínas diferem em tamanho e densidade na composição química e no elenco de apolipoproteínas. São elas: Quilomícrons, VLDL (Lipoproteína de Densidade Muito Baixa), IDL (Lipoproteína de Densidade Intermediária), LDL (Lipoproteína de Densidade Baixa) e HDL (Lipoproteína de Densidade Alta) (GENEST, 2003).

Os quilomícrons são responsáveis pelo transporte dos lípidos absorvidos pelo intestino, originários da dieta e da circulação entero-hepática. No fígado, o conteúdo de colesterol é regulado por três mecanismos principais: a) síntese intracelular do colesterol; b) armazenamento após esterificação; c) excreção pela bile. Na luz intestinal, o colesterol é excretado na forma de metabólitos ou como ácidos biliares. Metade do colesterol biliar é aproximadamente 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos e retornam ao fígado pelo sistema porta (ciclo entero-hepático). A VLDL é formada no fígado, rica em triglicerídeos endógenos. No sangue se fixa nos receptores capilares por meio da apoC, é hidrolisada pela lipase lipoproteica (LLP), sendo o ácido graxo entregue aos tecidos (SBC, 2007).

Por ação da lipase lipoproteica, os quilomícrons e as VLDL, progressivamente depletados de TG, se transformam em remanescentes, também removidos pelo fígado por receptores específicos. Uma parte das VLDL dá origem às IDL, que são removidas rapidamente do plasma. O processo de catabolismo continua, envolvendo a ação da lipase lipoproteica hepática e resultando nas LDL, que permanecem por longo tempo no plasma. Esta lipoproteína tem um

conteúdo apenas residual de triglicérides e é composta principalmente de colesterol e uma única apolipoproteína, a apo B100. As LDL são removidas pelo fígado através dos receptores B/E. A expressão desses receptores é a principal responsável pelo nível de colesterol no sangue e depende da atividade da enzima hidroximetilglutaril (HMG) CoA redutase que é a enzima-chave intracelular para síntese do colesterol hepático. (SBC, 2007).

As partículas de HDL são formadas no fígado, no intestino e na circulação e seu principal conteúdo protéico é representado pelas apos A-I e A-II. O colesterol livre da HDL, recebido das membranas celulares, é esterificado por ação da lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT). A apo A1, principal proteína da HDL, é cofator dessa enzima. O processo de esterificação do colesterol, que ocorre principalmente nas HDL, é fundamental para sua estabilização e transporte no plasma, no centro desta partícula. A HDL transporta o colesterol até o fígado onde este é captado pelos receptores SR-B1. O circuito de transporte do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado é denominado transporte reverso do colesterol. Neste transporte, é importante a ação do complexo "ATP Binding Cassete" A1 (ABC-A1) que facilita a extração do colesterol da célula pelas HDL. A HDL também tem outras ações que contribuem para a proteção do leito vascular contra a aterosclerose, tais como a remoção de lipídeos oxidados da LDL, inibição da fixação de moléculas de adesão e monócitos ao endotélio e estimulação da liberação de óxido nítrico (SBC, 2007).



**Figura 3** - O metabolismo das lipoproteínas Fonte: Kassim et al.,2010.

#### 1.4 Camundongo $apoE^{-/-}$ knockout ( $apoE^{-/-}$ ko) como modelo para o ser humano

A aterosclerose é um processo multifatorial onde fatores ambientais e genéticos tem um significativo papel, e tal processo em humanos leva um longo período de tempo, portanto, modelos animais foram desenvolvidos onde o processo patológico é similar ao que ocorre em humanos, porém em um curto período de tempo (Kolovou, et al., 2014).

Para tanto, foi criado o camundongo *knockout* para apolipoproteína E (camundongo  $apoE^{-/-}$  ou  $apoE^{-/-}$  KO). Este foi desenvolvido para representar um modelo de estudo da aterosclerose. Para tanto, o gene que codifica a apolipoproteína E ( $apoE^{-/-}$ ) foi inativado nas células tronco embrionárias de um camundongo saudável. Em seguida, essas células foram inseridas em blastômeros de camundongos C57BL/6, foram gerados filhotes heterozigotos e

homozigotos para a apoE<sup>-/-</sup>, e através de cruzamentos entre as linhagens homozigotas foi originado o camundongo apoE<sup>-/-</sup> que apresenta elevados níveis de VLDL no plasma. O camundongo apoE<sup>-/-</sup> deficiente desenvolve marcante hipercolesterolemia com colesterol plasmático total cinco ou seis vezes maior em relação ao controle, com uma dramática mudança no perfil lipídico. De particular interesse, este animal desenvolve espontânea aterosclerose com uma dieta padrão normal (Plump *et al.*, 1992; Hofker *et alii*, 1998).

A apoE<sup>-/-</sup> é uma glicoproteína presente na membrana das lipoproteínas, sintetizada primariamente no fígado, mas que também pode ser produzida em vários tecidos. Pode ser encontrada no plasma, mas está localizada, preferencialmente nas VLDL, IDL e HDL respectivamente. A apoE<sup>-/-</sup> tem a função de retirar do plasma as VLDL e IDL via receptor de LDL. Portanto, sem a apoE<sup>-/-</sup> ocorre aumento do colesterol plasmático para valores superiores a 500mg/dl, a maioria de VLDL (Plump *et al.*, 1992; Jawień *et al.*, 2004).

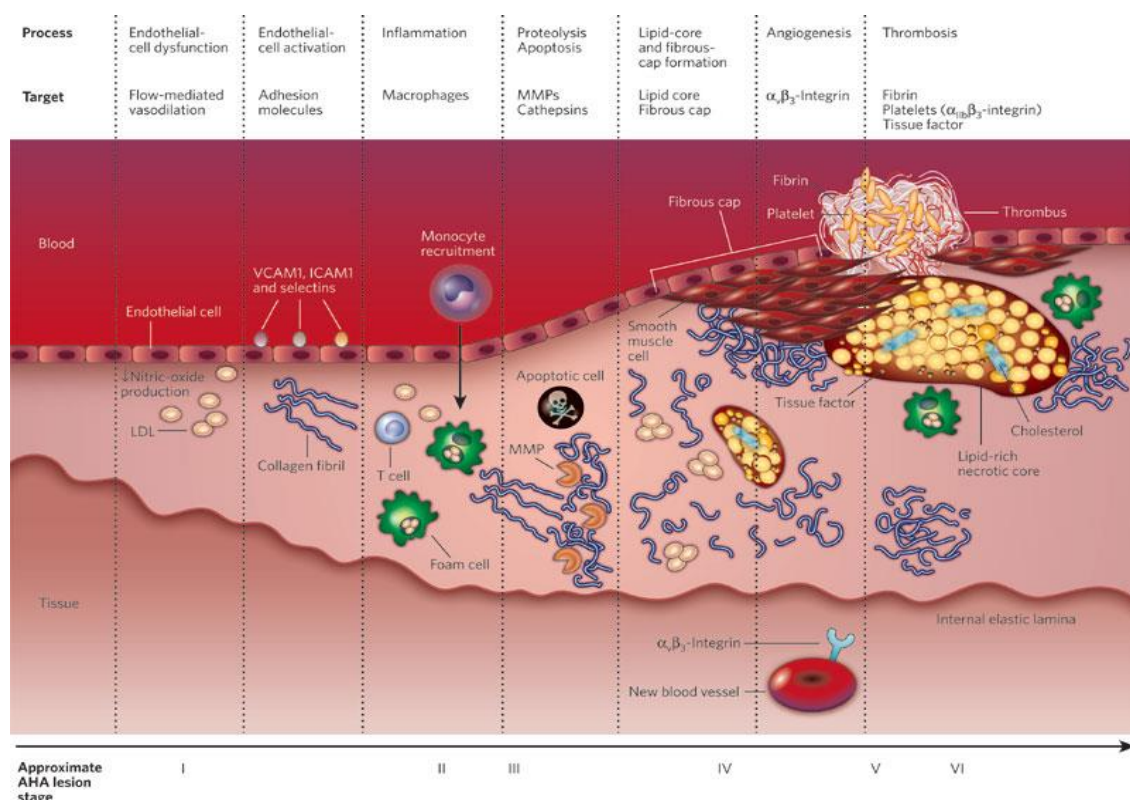
## 1.5 Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença que atinge os vasos sanguíneos e pode resultar em doenças coronarianas, como o infarto agudo do miocárdio, e doenças cerebrovasculares, como o acidente vascular encefálico. Essas duas doenças foram responsáveis por 7,3 milhões e 6,2 milhões, respectivamente, das 17,7 milhões de mortes ocorridas devido a doenças cardiovasculares em 2008 (WHO, 2011).

Vários são os fatores que promovem o desenvolvimento da aterosclerose, e tais fatores são chamados fatores de risco. Para o desenvolvimento da aterosclerose, os fatores de risco envolvidos são os comportamentais: tabagismo, sedentarismo, dieta não saudável e alcoolismo; metabólicos: hipertensão, diabetes, dislipidemias e excesso de peso e obesidade; e outros: baixa renda, baixo índice educacional, idade avançada, gênero, predisposição genética, fatores psicológicos (estresse, depressão, etc.) e a hiperhomocisteinemia. Há fortes evidências científicas que sugerem que os fatores comportamentais e metabólicos são responsáveis por mecanismos chave na etiologia da doença aterosclerótica (WHO, 2011). Porém, a abundância relativa das diferentes lipoproteínas aterogênicas no plasma é de importância primordial para o desenvolvimento da aterosclerose, uma vez que são um pré-requisito para o desenvolvimento da maior parte das formas da doença (Lusis, 2000).

A aterosclerose é uma doença inflamatória sistêmica crônica, de desenvolvimento mais comum em artérias de grande e médio calibre, e decorre a partir de dois processos básicos: Primeiro a entrada e acúmulo de colesterol e seus substratos na túnica íntima, e segundo com a migração de células musculares lisas (CMLV) da túnica média, leucócitos do sangue e uma quantidade variável de tecido conectivo que forma a placa fibrosa, que modifica a túnica média, se projeta para o lúmen do vaso e resulta em uma série de alterações vasculares (Figura 4) (Camacho & Melicio., 2007; Quyyumi, 1998). Diversas evidências mostram que a entrada da LDL na túnica íntima com sua posterior oxidação é o principal fator desencadeante da doença aterosclerótica. A LDL oxidada (LDLox) é citotóxica para as células endoteliais, assim as

células lesadas iniciam a expressão e produção de uma série de substâncias pró-inflamatórias e quimiotáticas para os leucócitos, como molécula de adesão intercelular (ICAM-1), E-selectina e molécula de adesão vascular (VCAM-1) (Camacho & Melicio., 2007).



**Figura 4:** Panorama geral da aterosclerose. Fonte: Sanz & Fayad.,2008.

Na figura acima é possível observar a composição da placa aterosclerótica, bem como sua ruptura, exposição do conteúdo subintimal e formação de trombo.

Além disso, o próprio LDLox regula positivamente a expressão de genes para citocinas como, fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) e a proteína quimiotática de monócito, exercendo assim um efeito quimiotático para monócitos (Lusis, 2000). O LDLox pode também inibir a produção de óxido

nítrico (NO), um potente mediador químico com propriedades anti-aterogênicas (Lusis, 2000).

Após a entrada no tecido, os monócitos se diferenciam em macrófagos e iniciam a fagocitose do LDLox presente na túnica íntima, assim formando as células espumosas, que são importantes constituintes da placa de ateroma. A rápida fagocitose do LDLox pelos macrófagos é mediada através de um grupo de receptores que reconhecem uma grande variedade de ligantes, são os chamados receptores *scavenger*. Dois desses receptores (SR-A e CD36) parecem representar maior importância no desenvolvimento da doença, uma vez que animais que não expressam tais receptores apresentam redução nas lesões ateroscleróticas (Lusis, 2000).

As células espumosas desempenham um importante papel na atração de células musculares lisas para a túnica íntima. Macrófagos em cultura liberam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (FCDP), fatores de transformação  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Esses fatores de crescimento são poderosos atraentes de CMLV, resultando em migração e proliferação dessas células. Citocinas derivadas dos macrófagos, como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1), estimulam as células endoteliais e do músculo liso a produzir FCDP, e assim influenciam o desenvolvimento da doença indiretamente. (Boyle et al., 1997).

A redução de NO, em consequência à disfunção endotelial, também está relacionada ao favorecimento da proliferação celular, por se tratar de um importante fator antiproliferativo. Além disso, a disfunção endotelial favorece a

trombogênese, que pode gerar êmbolos, os quais migram para vasos de menor calibre, levando a isquemia e infarto tecidual (Da Luz & Uint, 2003; Gryglewski et al., 1986).

## 1.6 Estresse oxidativo

Halliwell e colegas descreveram radicais livres como algumas espécies capazes de existir independentemente e que contenham um ou mais elétrons não pareados. O termo espécies reativas de oxigênio (ERO's) refere a uma variedade de moléculas reativas que são derivadas do oxigênio e podem ser radicais livres, como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) ou radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), ou não radical, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Por outro lado, o termo espécies reativas de nitrogênio se refere a moléculas reativas derivadas do nitrogênio, e podem ser classificados como íons peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), ou não íons (óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ )). Estas espécies reativas são formadas em um baixo nível durante a execução de funções celulares fisiológicas. De fato, a cadeia transportadora de elétrons localizada na mitocôndria é responsável pela maior parte do superóxido que é gerado pela redução parcial do oxigênio (Bolisetty.,2013). Outros sistemas enzimáticos responsáveis para a geração de ERO's incluem: aminoácido oxidases, citocromo p450, ciclooxygenases, lipoxigenases, xantina oxidases (Bolisetty, 2013). Vários estudos realizados nos últimos anos tem demonstrado que as espécies reativas de oxigênio participam ativamente em diversos processos biológicos, incluindo o crescimento normal da célula, a diferenciação celular, apoptose e senescência celular (Bolisetty. 2013).



A mitocôndria é a organela mais ativa na célula, consumindo em torno de 90 % do total de oxigênio para desta forma permitir a síntese de ATP. Sendo que baixos níveis de ânion superóxido são produzidos constantemente durante a respiração celular normal em uma mitocôndria saudável, muitas vias estão envolvidas na neutralização deste ânion (Bolisetty, 2013). Por exemplo, a superóxido dismutase mitocondrial converte rapidamente o superóxido a peróxido de hidrogênio, outra espécie reativa. Esta molécula pode então ser convertida a água pela catalase ou pela glutathionaperoxidase na mitocôndria ou após a difusão para o citoplasma.

Em adição, as células são equiparadas com uma variedade de moléculas antioxidantes, como a glutathione, ácido ascórbico, e alfa-tocoferol, sendo estas capazes de reduzir as ERO's. A glutathione contém um grupo sulfidril que é reduzido por estas espécies, portanto, a glutathione protege os componentes vitais da mitocôndria servindo de substrato para as ERO's (Bolisetty.,2013).

Normalmente a produção de EROs é contrabalanceada por vias enzimáticas e não enzimáticas; entretanto, quando o organismo excede a capacidade protetora antioxidante, ocorre o estresse oxidativo (Stocker & Keaney.,2004 ). Os altos níveis de ROS encontrados na aterosclerose são importantes mediadores de danos nos componentes celulares, tais como hidratos de carbono, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Valko et al., 2007). Situações onde ocorre aumento da produção de EROs, redução da atividade do sistema antioxidante e aumento do estresse oxidativo estão associadas ao desenvolvimento de enfermidades como o câncer, artrites, doenças

neurodegenerativas e cardiovasculares (Griendling & Fitzgerald, 2003; Navas-Acien et al., 2005; Prozialeck et al., 2006 e Valko et al., 2006)

Desta forma, em condições de aumento do estresse oxidativo, como observado na aterosclerose, um tratamento antioxidante pode ser conveniente para reduzir a produção de ROS, surgindo como uma alternativa útil para evitar o dano tecidual.

### **1.7 Via da Ciclooxygenase (COX)**

Os principais prostanóides produzidos in vivo são: Prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), Prostaciclina ( $PGI_2$ ), Prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ), Prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), e Tromboxano  $A_2$ . Eles são produzidos por praticamente todos os tecidos, e geralmente cada célula sintetiza um ou dois produtos dominantes, que atuam de maneira parácrina ou autócrina para manter a homeostase corporal. Durante uma inflamação, tanto o nível, como o perfil de prostanóides secretados muda dramaticamente (Ricciotti & FitzGerald., 2011).

A produção de prostanóides depende da atividade de enzimas que exibem atividade bifuncional de ciclooxygenase, e de peroxidase. Tais enzimas são denominadas prostaglandinas G/H sintases, ou simplesmente, COX. Existem duas principais isoformas da COX, a COX-1, e a COX-2. A COX-1, considerada a isoforma constitutiva, é expressa em muitos tecidos, sintetiza pequenas quantidades de PGs, e tem como principal função a manutenção das funções fisiológicas; e a COX-2, conhecida por ser induzida em algumas células por estímulos inflamatórios, hormônios e fatores de crescimento, é a

principal fonte de prostanóides durante inflamação, e em doenças proliferativas, como o câncer (Smith et al., 1996). Contudo, ambas as enzimas podem contribuir em processos homeostáticos, e em processos inflamatórios (Ricciotti & FitzGerald., 2011).

As Ciclooxygenases produzem a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ), produto intermediário das prostaglandinas, que serve como substrato para uma série de sintases específicas, as quais são: prostaglandina  $E_2$  sintase (PGES) prostaglandina  $I_2$  sintase (PGIS), prostaglandina  $D_2$  sintase (PGDS) prostaglandina F sintase (PGFS) e tromboxano sintase (TXS), as quais produzem  $PGE_2$ ,  $PGI_2$ ,  $PGD_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$  and  $TXA_2$ , respectivamente. A COX-1 acopla preferencialmente, mas não exclusivamente à tromboxano sintase, prostaglandina F sintase, e prostaglandina E sintase, enquanto a COX-2 acopla de forma preferencial à protaciclina sintase, e à prostaglandina E sintase (Ricciotti & FitzGerald., 2011).

O perfil de produção de prostanóides no local de inflamação é determinado pela expressão destas enzimas que se acoplam às COX's nas células.

Uma vez secretados pelas células que os sintetizam, os prostanóides exercem seus efeitos via receptores específicos: TP para o  $TXA_2$ ; IP para a  $PGI_2$ ; FP para o  $PGF_2$ ; DP1 ou DP2 para a  $PGD_2$  e para a  $PGE_2$  são descritos 4 subtipos de receptores denominados EP1 – EP4. Esses receptores apresentam mecanismos diferenciados, relacionando-se de acordo com a subunidade na qual o mesmo se encontra ligado a proteína G. Sendo que, o grupo de receptores acoplados à proteína Gs (IP, DP, EP4, EP2) promove ativação da Adenilato ciclase, aumento do AMPc e consequente relaxamento do músculo

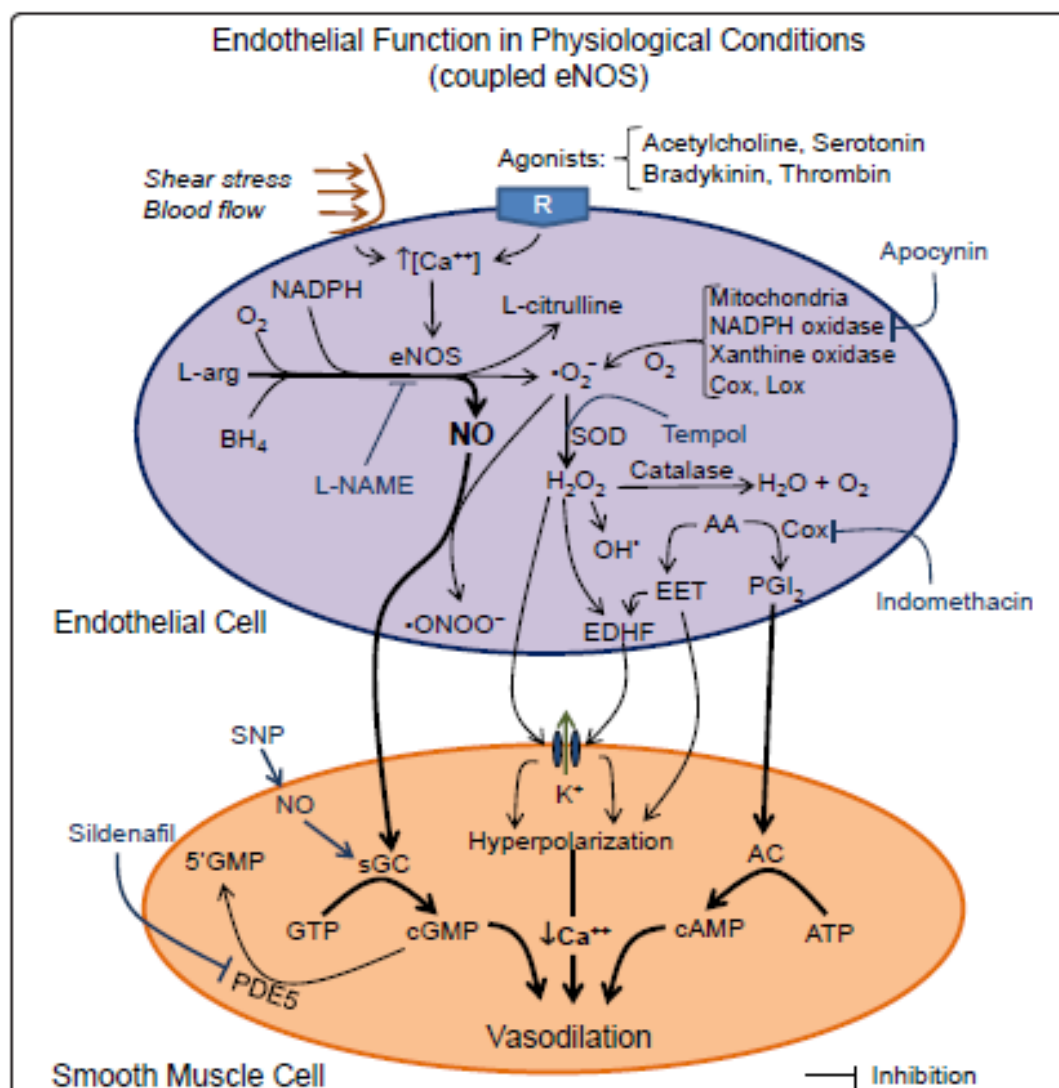
liso vascular. Ao passo que, os receptores EP1, FP e TP encontram-se acoplados à proteína Gq, e quando são estimulados controlam o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  e assim vasoconstrição. Este mesmo efeito é provocado pela ativação dos receptores EP3 e DP2 os quais são acoplados à proteína Gi. Quando ativados esses receptores promovem inibição da AC, diminuindo a formação de AMPc resultando em vasoconstrição (Ricciotti & FitzGerald, 2011; Funk, 2001; Wright et al., 2001).

### **1.8 Fوسفodiesterases e Sildenafil**

As fوسفodiesterases (PDE) são poderosas enzimas capazes de degradar rapidamente, e conseqüentemente, inativar AMPc ( para 5'AMP), e GMPc (para 5'GMP). Elas diferem com respeito a distribuição tecidual, especificidade ao substrato, regulação por cinases, etc. Sildenafil é um potente inibidor de fوسفodiesterase com alta afinidade para duas PDE que degradam GMPc. (Glossmann et al., 1999).

A Família de PDE-1 é ativada por cálcio-calmodulina e tem um baixo Km para o GMPc quando comparado ao AMPc. A PDE-1 é amplamente distribuída no cérebro e coração, e é inibida pelo sildenafil. A PDE-2 é uma família regulada por GMPc, na qual este se liga a um sítio regulatório não catalítico e ativa a enzima que então hidrolisa AMPc e GMPc. Esta enzima ocorre em neurônios olfativos, córtex da adrenal, e muitas áreas do cérebro, bem como também do corpo cavernoso. A PDE-3 é altamente específica para AMPc, mas apresenta, contudo, alta afinidade para GMPc, o qual é um inibidor alostérico. Em tecido

onde há predominância de PDE-3, um aumento no nível de GMPc pode acarretar em uma amplificação do AMPc. Um subtipo é expresso no músculo liso, plaquetas, e tecido cardíaco, outras no fígado e células adiposas. A PDE-3 é encontrada também no corpo cavernoso de seres humanos, e é muito bem inibida pelo sildenafil. A PDE-4 é grandemente distribuída nos tecidos, e é específica para a degradação de AMPc. A PDE-5 é seletiva para GMPc e contém um sítio de ligação não catalítico de alta afinidade para GMPc, similar ao das PDE-2 e PDE-6 (Stegbauer et al., 2013). Seu RNAm é expresso em células do músculo liso da aorta, coração, placenta, músculo esquelético, e pâncreas. A PDE-6 é similar à PDE-5 com respeito aos locais de origem, especificidade ao substrato, sítio de ligação não catalítico ao GMPc, e inibição por zaprinast ou sildenafil. Ela é um tetrâmero com uma subunidade alfa, uma beta, e duas subunidades gama (inibitórias). A ativação da PDE-6 leva a uma rápida degradação de GMPc, como consequência, há o fechamento de canais de sódio, levando a uma hiperpolarização da membrana. Sabe-se pouco sobre a função e regulação da PDE-7, a qual tem alta especificidade para AMPc, e é grandemente expressa em músculos esqueléticos, coração, rins, cérebro e linfócitos T. A PDE-8 similarmente à PDE-7, tem alta afinidade para o AMPc e é encontrada nos testículos, olhos, fígado, músculo esquelético e linfócitos T. A PDE-9 é específica para GMPc, sendo encontrada nos rins, pulmões, e cérebro (Glossmann et al., 1999).



**Figura 5.** Mecanismo de ação do sildenafil. Fonte: Meyrelles et al.: Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids in Health and Disease* 2011 10:211.

O Citrato de sildenafil foi o primeiro agente oral a ser introduzido contra disfunção erétil. Ele é um potente inibidor da PDE-5, e em menor extensão, da PDE-6 in vitro. Sildenafil tem uma biodisponibilidade oral de 40%. Altas concentrações plasmáticas são achadas após 0,5 à 2 horas no homem depois de ingerido. Em seres humanos, o sildenafil sofre metabolização hepática pelo citocromo P450(CYP3A4), tendo o seu anel piperazina desmetilado, e o

transformando em um metabólito ativo (UK 103,320) que apresenta metade de sua potência como inibidor da PDE-5 (Guimarães et al., 1999).

Pesquisas atuais demonstram os múltiplos efeitos benéficos do sildenafil, além daquele utilizado na disfunção erétil, e da hipertensão pulmonar, como por exemplo, um estudo feito em ratos diabéticos observou que tais ratos tiveram uma diminuição considerável no estresse oxidativo plasmático devido ao tratamento com inibidores de fosfodiesterase, dentre eles, o sildenafil (Milani et al., 2005).

Foi visto também que sildenafil possui efeito renoprotetor por prevenir a progressão de injúria renal em ratos hipertensos DOCA-sal, por seus efeitos antiinflamatórios, antifibróticos e antiapoptóticos (Bae et al., 2012).

Em modelos animais de infarto agudo do miocárdio, o uso de inibidores da fosfodiesterase 5, como o sildenafil, reduz o tamanho do infarto, a apoptose no miocárdio, a fibrose, e a hipertrofia, indicando que o sildenafil exerce efeitos cardioprotetores. É descrito na literatura também, que o sildenafil é capaz de aumentar o número de células progenitoras endoteliais (células que contribuem para o reparo vascular (Foresta et al., 2009).

No presente estudo nossa hipótese foi investigar se o modelo murino para aterosclerose apresenta hiper-reatividade vasoconstrictora à fenilefrina (FE). A possibilidade que a exacerbada vasoconstrição resulta em disfunção endotelial, nos levou a hipótese que o sildenafil possa restaurar a função normal do vaso, e investigar os mecanismos envolvidos no processo aterosclerótico.

**JUSTIFICATIVA**



## 2. JUSTIFICATIVA

As DCV são responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando custos médicos e socioeconômicos elevados. Considerando que a incidência de doenças cardiovasculares tornou-se uma questão de saúde pública alarmante, estratégias tem sido buscadas para tratar e minimizar os riscos de morbidade e mortalidade associados a estes eventos. O presente trabalho tem potencial de contribuir para a elucidação de uma possível alteração na função vascular dos camundongos submetidos a aterosclerose, e avaliar os possíveis efeitos benéficos do tratamento com sildenafil, que podem o levar a uma futura alternativa de tratamento da aterosclerose .

Mediante o exposto, este estudo tem como proposta investigar a eficácia do sildenafil na função contrátil do modelo murino de aterosclerose apoE<sup>-/-</sup> , consequentemente, avaliar se este tratamento é capaz de reduzir os danos provocados pela aterosclerose.

## **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar os efeitos vasculares do tratamento com sildenafil em camundongos com hipercolesterolemia e aterosclerose.

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar em aorta desses animais tratados com sildenafil, em relação aos não-tratados e os controles selvagens os seguintes desfechos:

- a reatividade vascular da aorta frente à fenilefrina;
- a participação do endotélio no mecanismo contrátil frente à fenilefrina;
- a participação da EROs no mecanismo contrátil frente à fenilefrina;
- a participação dos prostanóides no mecanismo contrátil frente à fenilefrina;
- o efeito do tratamento sobre os níveis de oxidação proteica avançada e peroxidação lipídica;
- o efeito do tratamento sobre a deposição lipídica vascular.

## **Materiais e Métodos**

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais experimentais

Neste estudo foram utilizados camundongos machos, isogênicos, *knockout* para apolipoproteína E (apoE<sup>-/-</sup>) os quais são hipercolesterolêmicos e desenvolvem aterosclerose espontaneamente, e seus respectivos controles da linhagem C57BL/6 controles (CT) .

Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular da Universidade Federal do Espírito Santo, até o momento da realização dos experimentos, em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com temperatura (23°C) e umidade (55%) controladas, onde receberam água e ração *Ad libitum*. A utilização e o manuseio experimental dos animais neste biotério estão de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CNTBIO) e foi realizada mediante prévia aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais Experimentais (CEUA 07/2010).

### 4.2 Grupos experimentais

Ao atingirem 8 semanas de idade, os animais apoE<sup>-/-</sup> receberam dieta aterogênica Western Type (Rhoister, São Paulo, Brasil), contendo 41% de calorias em forma de lipídios e 1,5% de colesterol. Esta dieta foi administrada para acelerar o processo de desenvolvimento de disfunção endotelial e placa de aterosclerose, durante as 10 semanas subseqüentes

Tendo em vista avaliar os efeitos do tratamento com sildenafil na função vascular de animais hipercolesterolêmicos, os animais apoE<sup>-/-</sup> submetidos à dieta *Western type* foram subdivididos em 2 grupos: um grupo que recebeu sildenafil na dose de 40 mg/kg/dia, durante as três últimas semanas de dieta, via oral, e outro grupo que recebeu apenas o veículo. A dose acima foi escolhida porque se aproxima dos valores utilizados na prática clínica para o tratamento de hipertensão pulmonar em humanos (Dussault et al., 2009). O sildenafil foi obtido através da dissolução de comprimidos de Viagra® (Pfizer, São Paulo, Brasil) em água.

Os animais do grupo controle (CT) foram à dieta normal (Labina®, Purina, São Paulo, Brasil) durante o período experimental. Durante as três últimas semanas antes da eutanásia, os camundongos receberam diariamente veículo via oral, utilizando-se aproximadamente do mesmo volume que os animais apoE<sup>-/-</sup>.

#### **4.3 Avaliação da função vascular**

Posteriormente ao tratamento, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (200mg/kg, i.p., Cristália, São Paulo, Brasil). O animal foi submetido à toracotomia para exposição do coração e aorta, que então foram retirados. A artéria aorta foi colocada em placa de Petri, contendo solução nutritiva tampão de Krebs modificada (concentrações em mM: NaCl 115, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25, EDTA 0,1, glicose 11,1), pH 7,4, previamente aerada, e o tecido conjuntivo foi delicadamente retirado. Após a aorta torácica ter sido limpa do tecido conjuntivo, foi cortada em 3 ou 4 anéis

de aproximadamente 3 milímetros cada. Em seguida, os anéis foram colocados em triângulos de aço inoxidável e montados em preparação para avaliação da reatividade vascular, utilizando-se a mesma solução nutritiva previamente descrita, a 37°C e pH 7,4, constantemente aerada por mistura carbogênica contendo 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. As respostas vasculares frente à administração de agentes vasoativos foram captadas por um sistema de aquisição de dados (MP100, BIOPAC Systems, Santa Barbara, EUA) e plotadas em curvas de variação de tensão em função da concentração das drogas administradas.

#### **4.3.1 Avaliação da viabilidade dos anéis e teste do endotélio**

A viabilidade dos anéis foi avaliada por meio de incubação de KCl 125 mM por 30 minutos, o qual é o padrão ouro para avaliação de contração máxima vascular. Foram considerados viáveis os anéis cuja contração máxima atingiu, no mínimo, o dobro do valor basal de tensão (0,5g). O teste da integridade do endotélio vascular foi realizado por meio da avaliação do relaxamento frente à acetilcolina (ACh, 10μM), após pré-contração com fenilefrina (FE, 10μM). O endotélio foi considerado viável quando este relaxamento foi maior que 50% da contração induzida por Phe. Nos protocolos em que foi avaliada a modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina, os anéis foram submetidos a uma remoção mecânica desta camada com o auxílio de uma haste de aço inoxidável que foi inserida na luz do vaso e friccionada à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina em induzir relaxamento, após a pré-contração com fenilefrina.

#### **4.3.2 Avaliação da reatividade vascular à fenilefrina**

Após a realização do teste de integridade do endotélio os anéis foram lavados três vezes com solução de Krebs-Henseleit para que retornassem à tensão basal. Posteriormente, foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (1  $\eta$ M à 30  $\mu$ M).

#### **4.3.3 Participação do Endotélio na Reatividade Vascular à Fenilefrina**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, em alguns experimentos, o endotélio foi removido mecanicamente, como descrito anteriormente. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina (10 $\mu$ M), em induzir relaxamento, após pré-contracção com fenilefrina. Sendo assim, curvas concentração-resposta à fenilefrina (1  $\eta$ M à 30  $\mu$ M) foram realizadas em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-).

#### **4.3.4 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil à Fenilefrina**

Para verificar a influência de EROs produzidas pela NADPH oxidase na contracção vascular, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina (1  $\eta$ M à 30  $\mu$ M) na presença e na ausência de Apocinina (30  $\mu$ M) um inibidor da enzima NADPH oxidase.



#### **4.3.5 Participação dos Prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil à Fenilefrina**

Para verificar a influência de prostanóides produzidos pela ciclooxigenase na contração vascular, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina na presença e na ausência de indometacina (10  $\mu$ M) um inibidor não seletivo das ciclooxigenases 1 e 2.

#### **4.4 Quantificação da lesão aterosclerótica**

Os animais foram eutanasiados com overdose de tiopental de sódio (200 mg/Kg,ip.), e o ventrículo esquerdo foi perfundido com 0,1 M de solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,4), seguido por uma solução de formaldeído à 4 % em PBS em uma pressão de 100 mm Hg. O arco aórtico e a porção ascendente da aorta foram removidos, e foi tirado o seu tecido perivascular. As aortas foram posteriormente destinadas para a observação de deposição lipídica *en face* através de coloração com o marcador de lipídeos Oil-Red. Todas as amostras eram submersas em solução alcoólica com o Oil-Red por 1 minuto e em seguida lavadas em uma cuba com água até retirar todo o excesso do corante vermelho. A análise da deposição lipídica foi realizada através da intensidade e extensão da coloração vermelha cujas imagens foram adquiridas usando uma câmera digital de alta resolução (Canon) e posteriormente digitalizadas para análise morfométrica pelo software “Image J” (domínio público - National Institute of Health, USA ).

#### **4.5 Dosagem de colesterol**

Amostras de sangue foram obtidas através de punção do ventrículo esquerdo de animais eutanasiados com overdose de tiopental de sódio. O sangue foi imediatamente transferido para um tubo contendo heparina e centrifugado à 3000 RPM durante 10 minutos. O plasma foi então separado, e imediatamente armazenado à – 20°C para posteriores ensaios. O colesterol plasmático, a lipoproteína de alta densidade(HDL), a lipoproteína de baixa densidade(LDL), e os triglicerídeos foram determinados usando um kit colorimétrico comercial Bioclin, Belo Horizonte, Brazil). A lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e a lipoproteína de densidade intermediária (IDL) foram estimados por subtração do HDL e do LDL do colesterol total.

#### **4.6 Avaliar o efeito do tratamento sobre os níveis de peroxidação lipídica e oxidação proteica**

A geração de radicais livres e a peroxidação lipídica são reações extremamente rápidas, sendo mensuradas pelos seus produtos, principalmente as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), entre os quais o malondialdeído (MDA) é o principal. Para mensurar os metabólitos reativos ao TBA, 50 µL de plasma foram diluídos com 125 µL de ácido tricloroacético 17.5% e 125 µL de ácido tiobarbitúrico à 0,6 % em um tubo. Posteriormente os tubos foram aquecidos por 30 minutos, e esfriados antes da adição de 125 µL de ácido tricloroacético 70%. As amostras foram então centrifugadas, e foi feita a leitura do sobrenadante à 532 nm, em um espectrofotômetro. Para o cálculo da

concentração de MDA nas amostras utilizou-se a seguinte fórmula:  
Concentração de MDA (nmol)= [Absorbância a 534 nm/ (coeficiente de extinção molar do MDAxcaminho óptico)] x diluição.

Um novo marcador para o estresse oxidativo, denominado de Produto da Oxidação Avançada de Proteínas (AOPP) foi descrito pela primeira vez por WITKO-SARSAT e colaboradores em 1996. O AOPP é gerado através da ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos pela ação oxidante de clorados, principalmente ácido hipocloroso. Os níveis dos produtos de oxidação proteica presentes no soro foram determinados por meio de um método que consiste na mistura de 40 µL, 160 µL de PBS (tampão fosfato salino), 10 µL de KI, e 20 µL de ácido acético glacial (ultrapuro), a qual foi feita diretamente em microplaca de fundo chato. A leitura da absorbância foi realizada com comprimento de onda de 340 nm. A curva para a realização desta leitura foi feita com o uso de cloramina T (curva de 10 a 100 µM). O resultado final foi expresso em µmol/L.

As respostas vasoconstritoras à FE foram expressas como porcentagem de contração em relação ao nível máximo de contração ao KCl. Para cada curva dose-resposta, a resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e o log da dose de agonista que produziu metade da  $R_{\text{máx}}$  ( $\log EC_{50}$ ) foram calculados por regressão não linear (Prism 5, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). A sensibilidade ao agonista foi expressa como  $pEC_{50}$  ( $-\log EC_{50}$ ). Nas curvas em que foi feito bloqueio farmacológico, os resultados estão expressos como a diferença entre as áreas abaixo da curva na presença e ausência do fármaco inibidor (dAUC), representando a modulação do fator bloqueado sobre a resposta observada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para análise estatística das curvas entre os grupos, do  $R_{\text{max}}$  e  $pEC_{50}$  (antes e após bloqueio ou retirada do endotélio) foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas, seguida pelo post hoc de Tukey

As comparações do  $R_{\text{max}}$ ,  $pEC_{50}$ , deposição lipídica, dosagem de colesterol, TBARS e AOPP foram feitas por ANOVA de 1 via seguido pelo post hoc de Tukey. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## **RESULTADOS**

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Perfil lipídico plasmático

Na tabela 1 são mostrados os dados dos perfis lipídicos de todos os grupos experimentais. Como podemos observar, os animais do grupo apoE<sup>-/-</sup>, que receberam a dieta aterogênica, apresentaram um aumento significativo nos parâmetros do perfil lipídico, sendo de 4 vezes nos triglicerídeos, 12 vezes no colesterol total e 40 vezes no VLDL + IDL quando comparados ao grupo controle. Em relação ao HDL, houve uma redução de 3 vezes na concentração plasmática dessa lipoproteína no grupo apoE<sup>-/-</sup> em relação ao grupo controle. O sildenafil não causou nenhuma alteração no perfil lipídico de animais apoE<sup>-/-</sup>.

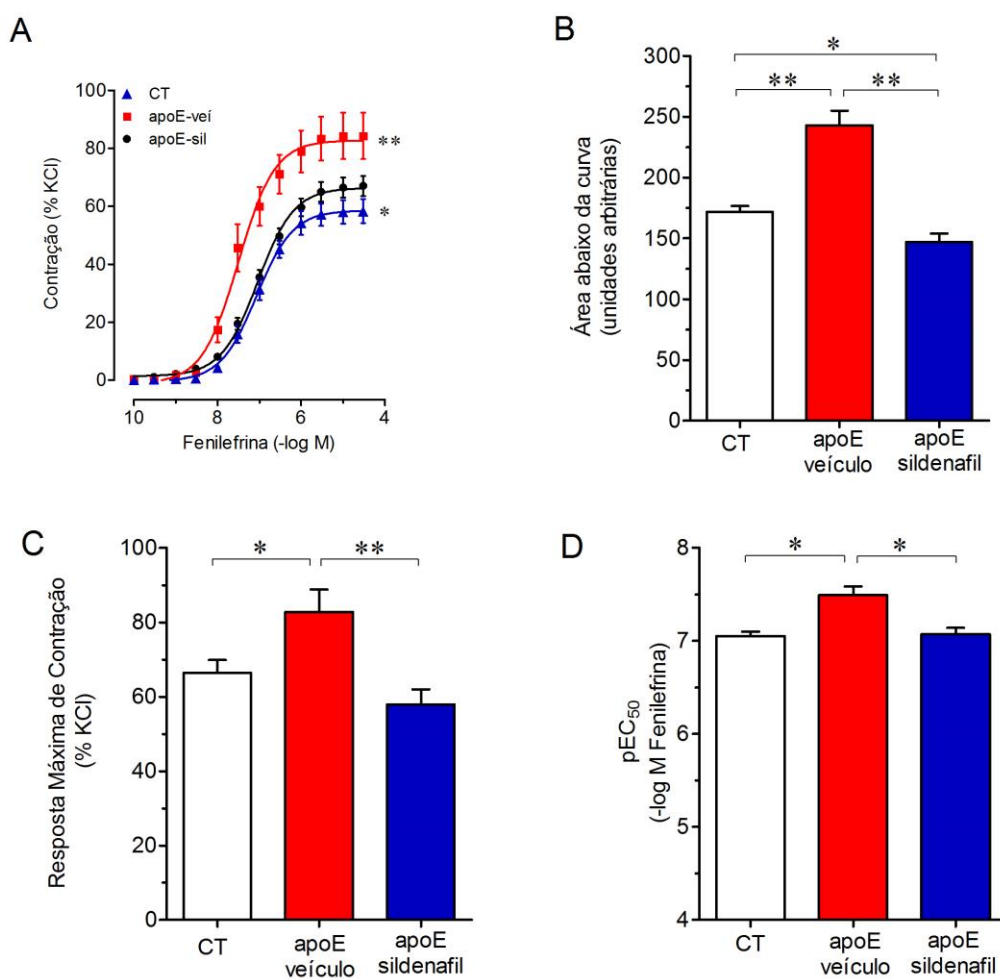
Lipídios (mg/dL)	Controle	Apolipoproteína E knockout	
	(10)	Veículo(10)	Sildenafil (8)
Triglicerídeos	66 ± 7	254 ± 31**	192 ± 35*
Colesterol Plasmático Total	98 ± 6	1201 ± 123**	1277 ± 117**
LDL	27 ± 3	169 ± 19**	182 ± 21**
HDL	62 ± 5	19 ± 6**	15 ± 1.5**
VLDL + IDL (mg/dL)	28 ± 5	1180 ± 43**	1143 ± 43**

Table 1. perfil lipídico plasmático de animais controle (CT), apoE<sup>-/-</sup> veículo e apoE<sup>-/-</sup> tratados com sildenafil. Os resultados são expressos como média ± EPM. \*p<0.05 e \*\*p<0.01 vs. control WT (ANOVA 1 via ).(\*Tabela retirada do artigo Leal et al., 2015).

### 6.2 Reatividade Vascular à fenilefrina

O aumento da resposta contrátil à FE em aortas de animais apoE<sup>-/-</sup> (Fig. 6 A),

confirmou nossa hipótese que a disfunção endotelial em vasos de condutância deste modelo de aterosclerose inclui o desbalanço entre componentes vasodilatadores e vasoconstrictores. Ao analisarmos a área abaixo da curva (AUC), podemos observar que o grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo exibiu um aumento neste parâmetro ( $243 \pm 15$  u.a., (Fig. 6 B),  $p < 0.01$ ), aumento na resposta máxima (Rmax:  $83 \pm 8\%$ , Fig. 6 C,  $p < 0.05$ ), e um aumento na sensibilidade à FE ( $7.5 \pm 0.09$   $-\log M$  of FE, (Fig. 1D),  $p < 0.05$ ) comparado ao grupo controle C57 ( $172 \pm 5$  u.a. and  $66 \pm 4\%$  and  $7.0 \pm 0.05$   $-\log M$  FE, respectivamente). O tratamento com sildenafil normalizou todos estes parâmetros.

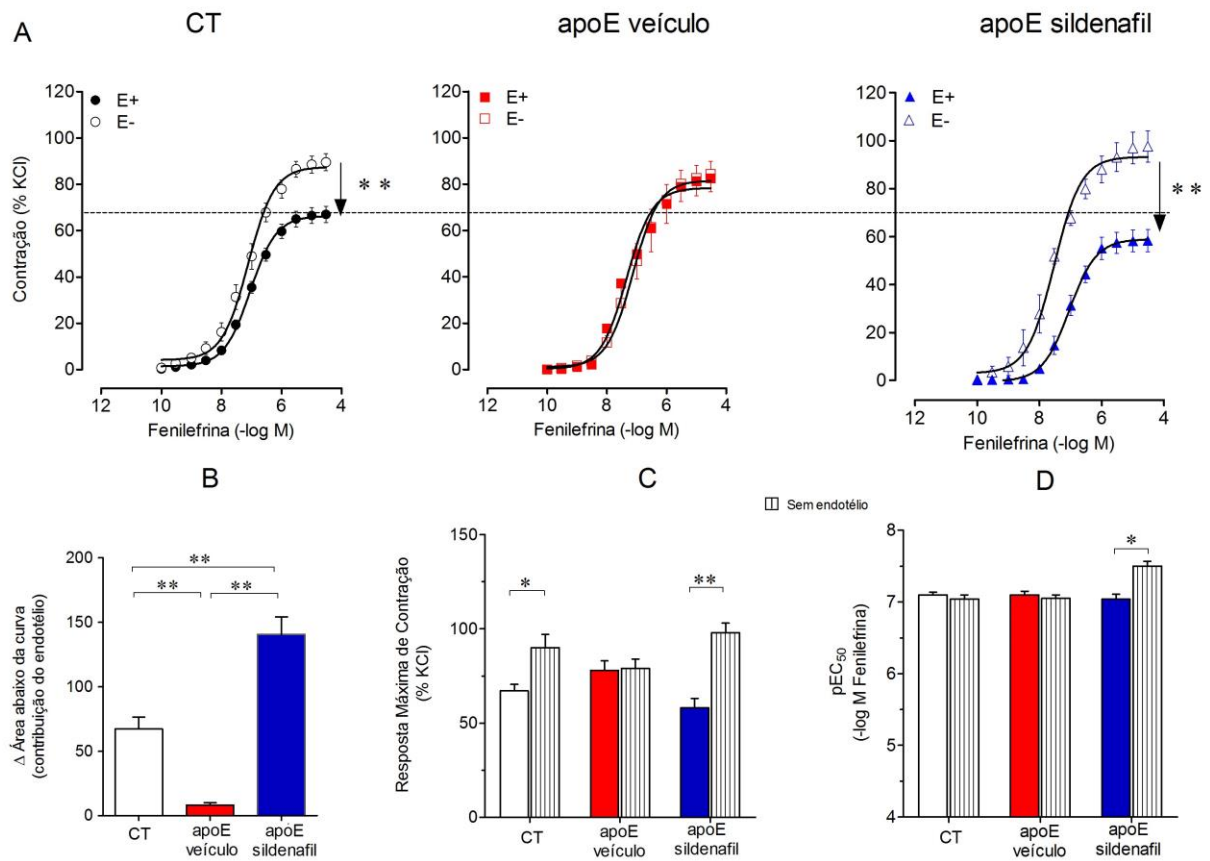


**Figure 6. Efeito do tratamento com sildenafil na vasoconstrição em camundongos ApoE<sup>-/-</sup>.** Curva concentração-resposta à fenilefrina induziu contrações em anéis de aorta de camundongos controle CT, apoE<sup>-/-</sup> veículo, e apoE<sup>-/-</sup> tratado com sildenafil. Os gráficos de barra mostram a área abaixo da curva (B), a resposta máxima (C), e a sensibilidade (D) destes mesmo grupos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  [ANOVA 1 via (A) ou ANOVA 2 vias (B, C e D)].



### 6.3 Participação do Endotélio na Reatividade Vascular à Fenilefrina

O dAUC antes e após a remoção do endotélio foi de  $67 \pm 9$  u.a. no grupo controle (Fig. 7B), próximo a zero no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo ( $8 \pm 2$  u.a.), e significativamente aumentada no grupo apoE<sup>-/-</sup> tratado com sildenafil ( $141 \pm 14$  u.a.,  $p < 0.01$ ). Como podemos ver na figura 7C, a resposta máxima foi significativamente aumentada no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo quando comparada ao grupo controle ( $86 \pm 5$  vs.  $67 \pm 3$  %,  $p < 0.05$ ), e o tratamento com sildenafil foi capaz de normalizar esta resposta ( $58 \pm 5$  %). De forma similar com o experimento da figura 6, neste protocolo também observamos um aumento na sensibilidade à FE no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo (+6%), e o sildenafil foi capaz de normalizar este parâmetro. Após a remoção do endotélio, o grupo tratado com sildenafil obteve um aumento na sensibilidade à FE de 6 % .



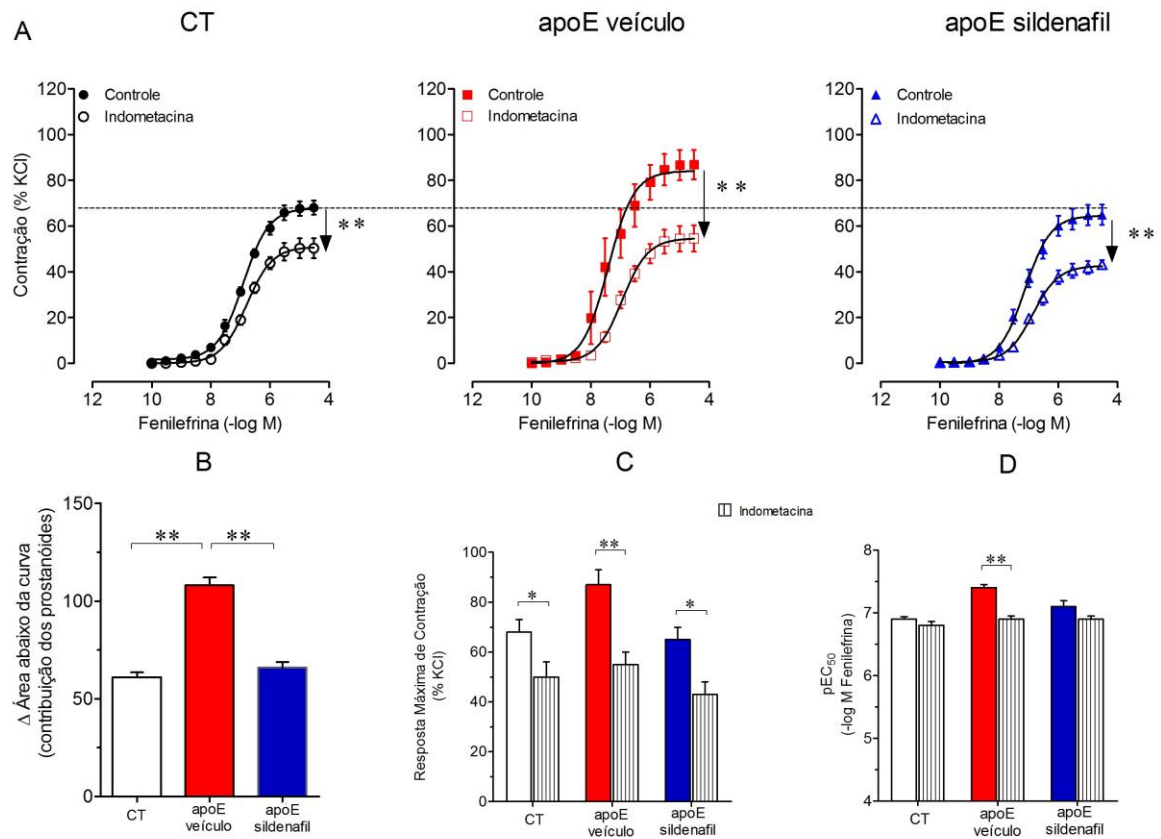
**Figure 7. Modulação do endotélio sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta e o efeito do tratamento com sildenafil em animais ApoE<sup>-/-</sup>.**

Curva concentração-resposta à fenilefrina induziu contrações em anéis de aorta de camundongos controle, ApoE<sup>-/-</sup> veículo, e ApoE<sup>-/-</sup> tratado com sildenafil na presença (E<sup>+</sup>) e na ausência (E<sup>-</sup>) do endotélio (A). Os gráficos de barra mostram a diferença entre as áreas abaixo da curva antes e após a remoção do endotélio (B), a resposta máxima (C), e a sensibilidade (D) destes mesmo grupos. Os resultados são expressos como média ± EPM.

\*p<0.05 and \*\*p<0.01 [ANOVA 2 vias (A), ANOVA 1 vias (B), e ANOVA 2 vias (C e D)].

#### **6.4 Participação dos Prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a Fenilefrina**

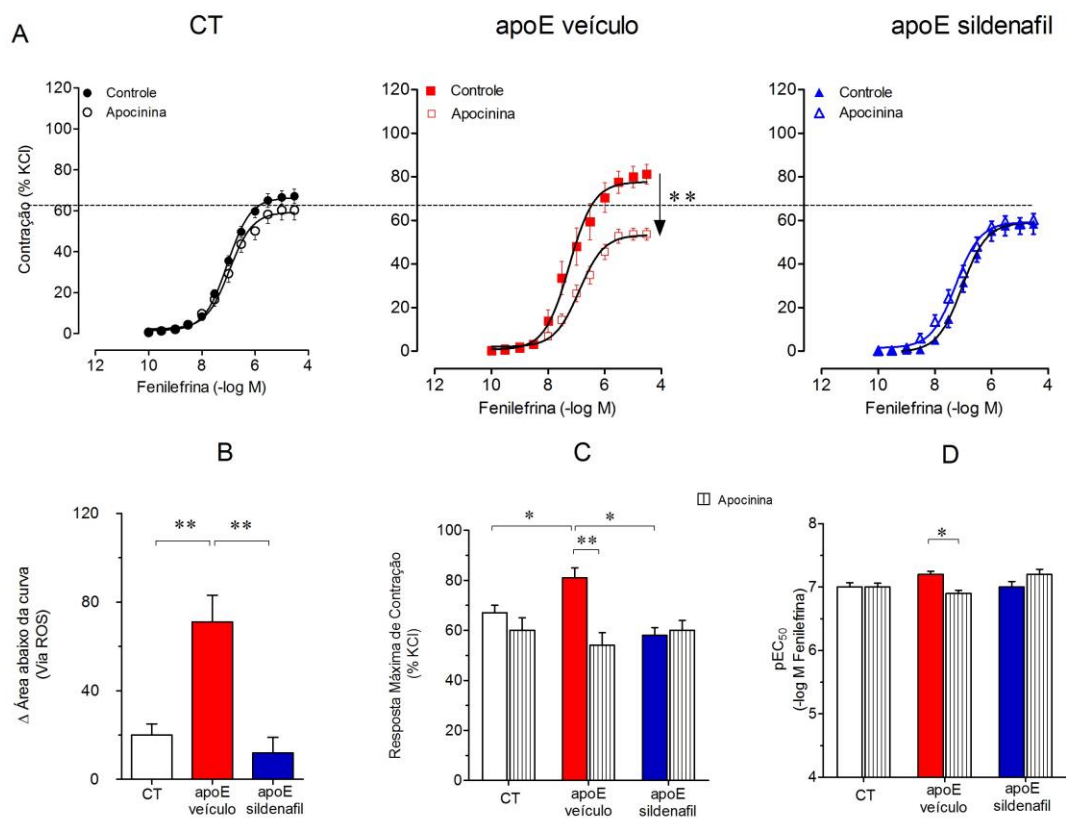
O dAUC antes e após o bloqueio com indometacina foi significativamente aumentado no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo ( $108 \pm 10$  a.u.,  $p < 0.01$ ), comparado ao grupo controle ( $61 \pm 6$  u.a.) (Fig. 8B), e o tratamento com sildenafil foi capaz de normalizar este parâmetro ( $66 \pm 6$  a.u.,  $p < 0.01$ ). Como mostrado na figura 8C, a resposta máxima foi significativamente aumentada no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo comparado ao grupo controle (Rmax:  $87 \pm 5$  vs.  $68 \pm 5$  %,  $p < 0.05$ ), e o tratamento com sildenafil foi capaz de normalizar este parâmetro (Rmax:  $65 \pm 5$  %). Após o bloqueio com indometacina a resposta máxima diminuiu significativamente no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo (37%,  $p < 0.05$ ), no grupo controle (27%,  $p < 0.05$ ), e no grupo tratado com sildenafil (30%,  $p < 0.05$ ). A sensibilidade à FE no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo estava significativamente aumentada comparada aos grupos controle (7%,  $p < 0.05$ ) e sildenafil (6%,  $p < 0.05$ ), porém, após o bloqueio das ciclooxigenases 1/2, a sensibilidade foi normalizada no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo, enquanto nos grupos controle e sildenafil, não houve alteração neste parâmetro (Fig. 8D). Portanto, o bloqueio da via dos prostanóides diminuiu a hiperreatividade à FE, indicando que o aumento da resposta vasoconstrictora neste grupo é influenciado pelos prostanóides, como por exemplo tromboxano A<sub>2</sub>.



**Figure 8. Contribuição dos prostanóides derivados da via ácido araquidônico-ciclooxigenase na resposta contrátil a fenilefrina e o efeito do tratamento com sildenafil em animais apoE<sup>-/-</sup>** Curva concentração-resposta à fenilefrina induziu contrações em anéis de aorta de camundongos Controle, apoE<sup>-/-</sup> veículo, e apoE<sup>-/-</sup> tratado com sildenafil na presença e na ausência de indometacina (A). Os gráficos de barra mostram a diferença entre as áreas abaixo da curva antes e após a inibição das ciclooxigenases 1 e 2 com indometacina (B), a resposta máxima (C), e a sensibilidade (D) destes mesmo grupos. Os resultados são expressos como média ± EPM. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 [ANOVA 2 vias (A), ANOVA 1 vias (B), e ANOVA 2 vias (C e D)].

## 6.5 Participação das espécies reativas de oxigênio na resposta contrátil a Fenilefrina

O dAUC antes e após o bloqueio com apocinina foi significativamente aumentado no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo ( $71 \pm 11$  p<0.01), comparado ao grupo controle ( $20 \pm 5$  u.a. p<0.01), e o tratamento com sildenafil foi capaz de normalizar este parâmetro ( $12 \pm 6$  a.u., p<0.01) (Fig. 9B). Como mostrado na figura 9C, a resposta máxima foi significativamente aumentada no grupo apoE<sup>-/-</sup> ( $81 \pm 5\%$  p<0.05 ) comparado ao grupo controle ( $67 \pm 4\%$  ), e ao grupo sildenafil ( $58 \pm 4\%$ ). Após o bloqueio com apocinina a resposta máxima diminuiu significativamente no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo (- 33%), enquanto nos demais grupos não foi observada diferença. A sensibilidade à FE no grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo estava significativamente aumentada comparada aos grupos controle C57 ( $7.48 \pm 0.05$  vs.  $7.0 \pm 0.07$  -log M FE, p<0.05) e o sildenafil normalizou este parâmetro ( $7.0 \pm 0.09$  -log M FE) (Fig. 9D). O bloqueio da NADPH Oxidase aboliu o aumento da sensibilidade exibida pelo apoE<sup>-/-</sup> veículo, mas não exerceu nenhum efeito sobre os demais grupos. Estes resultados sugerem que as ERO's contribuem de forma importante para a hiper-reatividade no animal aterosclerótico, e que o sildenafil demonstra ter atividade antioxidante.

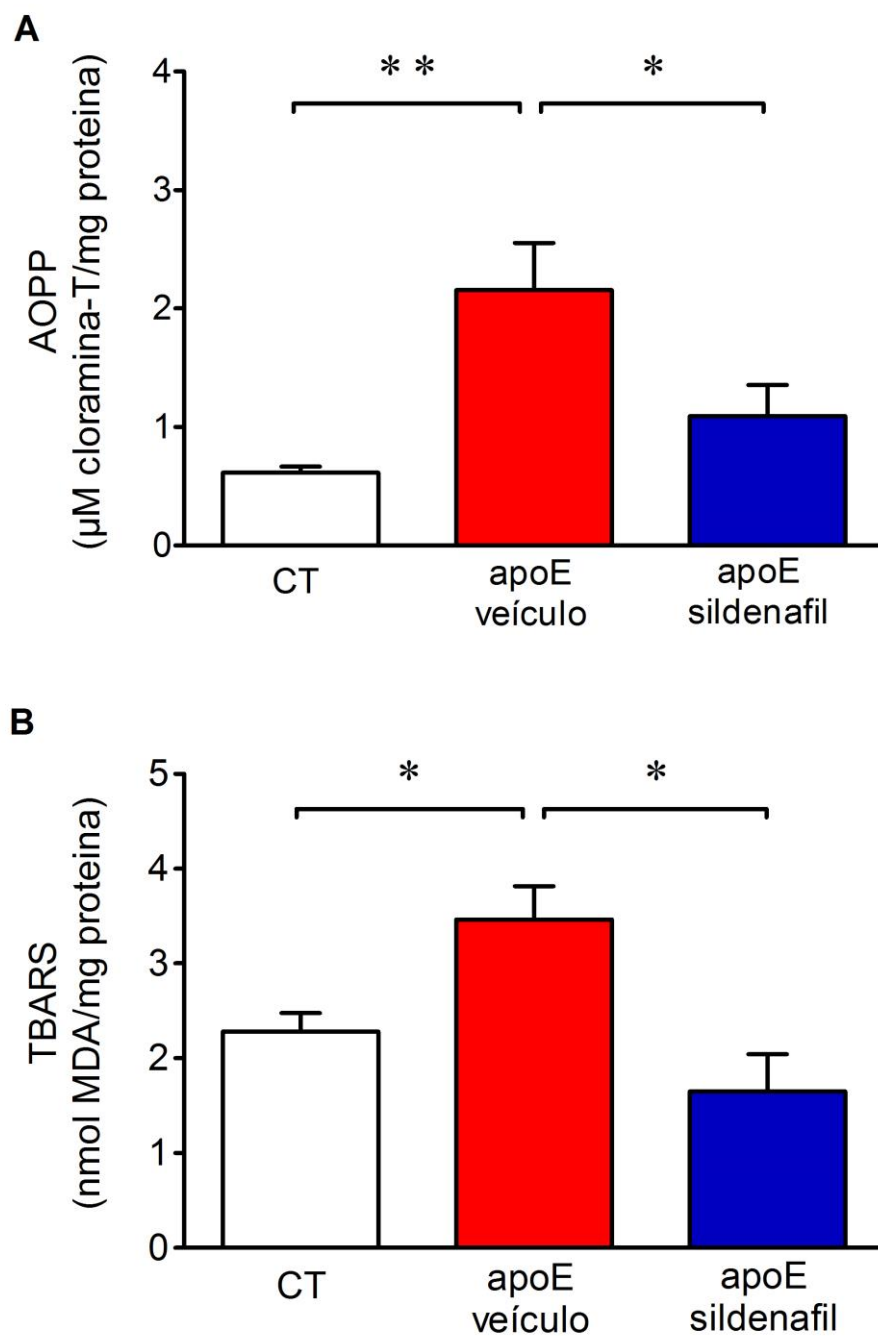


**Figure 9. Contribuição do estresse oxidativo na resposta contrátil à fenilefrina e o efeito do tratamento com sildenafil em animais apoE<sup>-/-</sup>** Curva concentração-resposta à fenilefrina induziu contrações em anéis de aorta de camundongos controle, apoE<sup>-/-</sup> veículo, e apoE<sup>-/-</sup> tratado com sildenafil na presença e na ausência de apocinina (A). Os gráficos de barra mostram a diferença entre as áreas abaixo da curva antes e após a inibição da NADPH Oxidase com Apocinina (B), a resposta máxima (C), e a sensibilidade (D) destes mesmos grupos. Os resultados são expressos como média ± EPM. \*p<0.05 and \*\*p<0.01 [ANOVA 2 vias (A), ANOVA 1 via (B), e ANOVA 2 vias (C e D)].

## 6.6 Marcadores de estresse oxidativo no plasma

A figura 10A mostra a média dos valores de proteínas plasmáticas oxidadas, determinadas pelo ensaio de Produtos de Oxidação Proteica Avançada (AOPP). O grupo apoE<sup>-/-</sup> veículo apresentou uma marcada elevação nos níveis de AOPP (3.5-fold,  $p < 0.01$ ), comparado ao grupo controle ( $0.6 \pm 0.04$   $\mu\text{M}$  chloramine-T/mg protein), e o tratamento com sildenafil causou uma significativa diminuição nos níveis desse marcador ( $1.1 \pm 0.2$   $\mu\text{M}$  chloramine-T/mg protein).

Em B temos a detecção indireta de peroxidação lipídica determinada pela reação entre o malondialdeído e o ácido Tiobarbitúrico. O apoE<sup>-/-</sup> veículo apresentou uma elevação plasmática de peroxidação lipídica, comparado ao grupo controle ( $3.5 \pm 0.3$  vs.  $2.3 \pm 0.2$  nmol MDA/mg protein,  $p < 0.05$ ). e o tratamento com sildenafil diminuiu esse marcador a valores próximos do controle ( $1.6 \pm 0.4$  nmol MDA/mg protein).

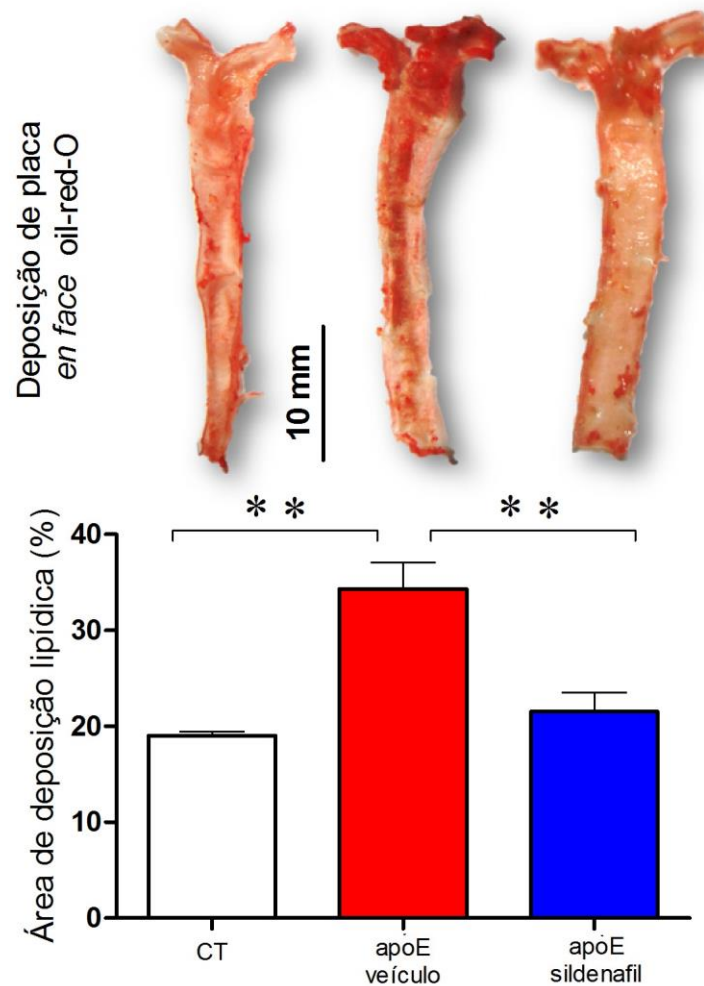


**Figure 10. Marcadores de estresse oxidativo no plasma de camundongos controle C57, apoE<sup>-/-</sup> veículo, e apoE<sup>-/-</sup> tratado com sildenafil** A: Produtos de Oxidação Proteica Avançada (AOPP). B: Peroxidação lipídica determinada pela reação do malondialdeído (MDA) com ácido tiobarbitúrico. Os valores são média  $\pm$  EPM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  (ANOVA 1 via).



### **6.7 Efeitos do sildenafil na deposição lipídica vascular**

Como representado na figura 11 em uma análise de deposição lipídica vascular em aorta pelo método en face corado com Oil-Red-O, os animais apoE<sup>-/-</sup> veículo apresentaram uma extensa deposição ao longo de sua aorta (~135%,  $p < 0.01$ ) comparado ao grupo controle ( $17 \pm 0.4$  %) e o tratamento com sildenafil foi capaz de reduzir a deposição de placa (40%,  $p < 0.01$ ).



**Figure11. Efeito do sildenafil na deposição lipídica vascular.** As imagens acima representam fotos típicas de aorta em face corada com Oil-red de cada um dos respectivos grupos estudados. O gráfico de barras mostra a média das áreas de deposição lipídica. Os valores são média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0.01$  (ANOVA 1 via).

## **DISCUSSÃO**

## 7. DISCUSSÃO

Como esperado, os animais apoE<sup>-/-</sup> tiveram um aumento do colesterol plasmático (Balarini et al., 2013) de aproximadamente 12 vezes em relação ao grupo controle, e o sildenafil não alterou o perfil lipídico como podemos observar nos resultados.

Nosso trabalho mostrou que o tratamento com o inibidor da PDE5, o sildenafil foi capaz de normalizar a resposta contrátil em aorta de camundongos hipercolesterolemicos ateroscleróticos. Os efeitos benéficos do sildenafil foram independentes do peril lipídico, e incluem a redução da deposição lipídica ao longo da aorta torácica, do estresse oxidativo dependente da NADPH Oxidase, redução de prostanóides vasoconstrictores derivados da via da Ciclooxygenase, e diminuição de marcadores sistêmicos do estresse oxidativo.

Tem sido observado por meio de experimentos in vivo e in vitro, uma mudança na reatividade de muitos vasos sanguíneos diante da aterosclerose. Uma diminuição no relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina tem sido extensamente demonstrado experimentalmente (Balarini et al., 2013 ;De Meyer & Herman, 1997). Contudo o efeito da aterosclerose na função contrátil ainda permanece controverso, pois o aumento e a diminuição da reatividade frente a agentes vasoconstrictores tem sido observados. Estas discrepâncias podem ser explicadas pelas seguintes condições: 1) avaliação da função endotelial em diferentes tipos e segmentos de artéria; 2) diferentes fases de desenvolvimento da aterosclerose; 3) diferentes tipos de agentes vasoconstrictores (Leal et al., 2015).

Nosso estudo demonstrou que animais ateroscleróticos apoE<sup>-/-</sup> apresentam hiper-reatividade à FE em aorta, e que animais tratados com sildenafil apresentaram redução da hiper-reatividade frente à FE.

Sabe-se que o endotélio vascular é uma importante estrutura de controle do tono vascular. Tais células regulam o tono vascular através da liberação de fatores que promovem a contração, ou o relaxamento vascular. A disfunção endotelial é um importante fator que leva à gênese de várias doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Em certas condições patológicas, como aterosclerose, hipertensão, e diabetes, há um comprometimento na função endotelial, o que acarreta no desequilíbrio de produção entre fatores vasodilatadores, e vasoconstrictores (Iwatani et al., 2008).

Neste estudo a manobra de remover o endotélio e comparar a diferença das áreas abaixo das curvas dos gráficos de contração à FE, nos revela a participação do endotélio. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram com primazia que animais apoE<sup>-/-</sup> ateroscleróticos, possuem a função endotelial da aorta prejudicada, o que acarreta em um quadro de hiper-reatividade frente à droga vasoconstrictora, e que o tratamento com sildenafil foi capaz de restabelecer a função endotelial melhorando a função vascular destes animais.

Em seguida, avaliamos a participação dos prostanóides na resposta contrátil. Já é bem estabelecido que a aterosclerose é uma doença inflamatória, e que drogas que tem atividade antiinflamatória, como a aspirina, exercem efeitos benéficos prevenindo a aterosclerose, e reduzindo eventos cardiovasculares. Parte da inflamação é mediada por prostaglandinas, as quais são produzidas

por enzimas denominadas Ciclooxygenases (COX). A enzima ciclooxygenase (COX) converte o ácido araquidônico em prostaglandina G<sub>2</sub> pela inserção de duas moléculas de oxigênio, e então reduzem este intermediário a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). A PGH<sub>2</sub> é um metabólito instável, que posteriormente é metabolizado por sintases células-específicas a produzir os cinco principais prostanóides: prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), Tromboxano A<sub>2</sub>, (TXA<sub>2</sub>) Prostaglandina E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>), Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), e Prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>). As cinco prostaglandinas se ligam a receptores acoplados a proteína G designados por IP, TP, EP (EP1, 2, 3, and 4), FP and DP (DP1 and 2), respectivamente. De todos estes prostanóides, os de maior importância são tromboxano A<sub>2</sub>, e prostaciclina (Ricciotti & FitzGerald., 2011).

Tromboxano A<sub>2</sub> é um mediador lipídico biologicamente ativo, e dentre suas muitas funções, as maiores são de agregação plaquetária, vasoconstrição, estimulante da proliferação de células musculares lisas vasculares, e agente inotrópico positivo. Tem-se acumulado evidências de que o acúmulo deste mediador lipídico está associado a patologias vasculares, particularmente aterosclerose e doença arterial coronariana, e várias pesquisas tem relatado efeitos benéficos de antiinflamatórios não esteroidais, como a aspirina, em prevenir eventos cardiovasculares, e tais efeitos estão associado a diminuição da produção de TXA<sub>2</sub> por plaquetas. A ação biológica do TXA<sub>2</sub> é mediada via seu receptor de membrana TP, o qual tem demonstrado ter importante papel no desenvolvimento da aterosclerose em camundongos apoE<sup>-/-</sup>, pois, como demonstrado por pesquisas, sua inibição diminui o desenvolvimento da aterosclerose. O TPr é um receptor acoplado a proteína G composto por 343

aminoácidos, e seu RNAm é expresso em vários tipos de células e tecidos, como células musculares lisas vasculares, células endoteliais, células epiteliais, plaquetas pulmão, rim, cérebro, e timo (Zhuge et al., 2006). Estudos recentes tem demonstrado que a expressão desse receptor está significativamente aumentada em artérias coronárias ateroscleróticas, quando comparado com artérias controle. Além disso, foi demonstrado em experimentos de cultura com células endoteliais, que o receptor TP pode estar relacionado ao desenvolvimento da aterosclerose, pois sua ativação na superfície destas células promove o aumento da expressão de moléculas de adesão para leucócitos. Outros estudos mostram que a estimulação do receptor TP em células endoteliais de veia do cordão umbilical de humanos resulta em um aumento da atividade de monocitos e células T por meio da proteína quimioatraente de monócitos ( MCP-1) (Zhuge et al., 2006).

O acúmulo de LDL colesterol em macrófagos na parede arterial leva à conversão destas nas chamadas células espumosas, e como já se tem relatado, este é passo inicial para o processo aterogênico. Os macrófagos contem a enzima Tromboxano sintase, e quando estes se transformam em células espumosas, são capazes de liberar grandes quantidades de  $\text{TXA}_2$ . Um estudo comparou a formação da placa aterosclerótica entre camundongos duplo nocaute para apoE<sup>-/-</sup> e TPr, e camundongos apoE<sup>-/-</sup> e encontrou uma diminuição de aproximadamente 70% de placa aterosclerótica na aorta proximal dos camundongos duplo nocaute, em relação ao apoE<sup>-/-</sup>, mostrando que o receptor TP é essencial no desenvolvimento da placa (Zhuge et al., 2006).

Outro prostanóide de grande relevância vascular é a prostaciclina. Dados tem demonstrado seu papel ateroprotetor. Este prostanóide exerce atividade de inibição da agregação plaquetária, adesão de leucócitos e modulação de CMLV. Foi demonstrado que a prostaciclina exibe importantes efeitos sobre as CMLV, pois tais células são quiescentes no estado fisiológico, porém em estados de injúria vascular, entram no ciclo celular, ativam sua proliferação, e aumentam sua capacidade migração, se tornam desdiferenciadas, e produzem grandes quantidades de matrix extracelular, atividades estas que contribuem para a formação da placa aterosclerótica. A prostaciclina tem mostrado exercer atividade de inibição da proliferação e da migração de CMLV, e um outro estudo mostrou que o tratamento com o análogo de prostaciclina, iloprost, induziu a diferenciação das CMLV via AMPc-PKA (Fetavello et al.,2006). Consequentemente, parece haver uma relação entre o efeito ateroprotetor da prostaciclina, e a modulação de CMLV. Camundongos geneticamente modificados também tem fornecido novas informações sobre os efeitos da prostaciclina na homeostase cardiovascular e na patogênese. Camundongos nocaute para o receptor IP apresentam-se propensos a trombooses, hiperplasia da camada íntima, reestenose, e aumento de dano provocado pela reperfusão. Além do mais, camundongos duplo nocaute para apoE<sup>-/-</sup>, e IP, demonstram desenvolver de forma mais rápida a placa aterosclerótica, apresentam alta reatividade plaquetária, e alta adesão leucocitária em células endoteliais (Stitham et al.,2011). Egan et al (2004) demonstrou que fêmeas em pré-menopausa nocaute para o receptor LDL, o efeito ateroprotetor do estrógeno é significativamente reduzido na ausência do receptor de prostaciclina. Além do mais, este mesmo autor mostrou que a



exposição de estrógeno a longo prazo, aumenta a expressão de COX-2, e a formação de 6-keto-PGF1 $\alpha$  (metabólito da prostaciclina) em células musculares lisas de aorta de camundongos, sugerindo assim uma significativa contribuição do estrógeno na ateroproteção via COX-2 e prostaciclina. Em humanos, a importância da PGI<sub>2</sub> na aterogênese também tem sido relatada, como foi demonstrado que pacientes que comportam uma variante disfuncional do receptor de prostaciclina (R212C) exibem um aumento no fenótipo aterotrombótico, alta incidência de doença arterial coronariana, e um alto número de eventos cardiovasculares, quando comparados a pacientes que apresentam receptores normais para PGI<sub>2</sub> (Arehart et al.,2008). Um outro estudo publicado por Patrignani et al. (2008), correlacionou positivamente R212C com hiperplasia da íntima, e trombose venosa profunda. Similarmente, mutações e polimorfismo no gene da prostaciclina sintase tem sido associado com hipertensão essencial, infarto do miocárdio, e infarto cerebral (Stitham et al.,2011). Somados a estes dados, o uso de inibidores da COX-2 como rofecoxib, resultou em aumento de eventos cardiovasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular encefálico isquêmico em pacientes predispostos, o que levou a retirada destes medicamentos do comércio. Estas últimas descobertas de eventos adversos relacionado à inibição de prostaciclina derivada de COX-2 demonstra que a diminuição da relação entre PGI<sub>2</sub> derivado da COX-2 e TXA<sub>2</sub> derivado da COX-1, é responsável em parte pelos efeitos aterotrombóticos, e demais eventos cardiovasculares (Stitham et al.,2011).

Visto que os produtos da COX exercem efeitos opostos na vasculatura, suas concentrações são críticas para prevenção ou progressão da aterosclerose.

Com o intuito de verificar a participação destes prostanóides na reatividade vascular, foi utilizado no presente estudo um protocolo clássico de curva concentração-resposta à FE com, e sem o inibidor inespecífico das Ciclooxygenases 1 e 2, indometacina. Sob o bloqueio, observou-se que animais apoE<sup>-/-</sup> veículo apresentaram uma redução na resposta contrátil, e um maior dAUC comparado ao controle e sildenafil (Figura 8B), o que sugere que a hiperreatividade à FE que estes animais apresentavam possa ser devido a predominância de TXA<sub>2</sub> sobre PGI<sub>2</sub>. Quando comparamos o dAUC entre o sildenafil e o grupo controle não observamos diferença, o que sugere que o sildenafil foi capaz de restaurar o balanço entre os níveis de PGI<sub>2</sub> E TXA<sub>2</sub>, desta formando exercendo um efeito benéfico na doença aterosclerótica.

Como já mencionado anteriormente, o endotélio possui a capacidade de liberar substâncias que atuam na regulação do tônus dos vasos sanguíneos, e a disfunção endotelial pode ser definida como um desequilíbrio entre a produção e biodisponibilidade de EDRFs e EDCFs, associados com o aumento da biodisponibilidade das EROs e diminuição da capacidade antioxidante caracterizada como estresse oxidativo (AVERSA, 2008).

Muitas evidências indicam que as espécies reativas de oxigênio também são importantes moléculas envolvidas no controle da reatividade vascular. Muitos pesquisadores tem relatado o papel da enzima NADPH Oxidase como uma das principais geradores de espécies reativas de oxigênio. (Shukla et al., 2005). NADPH Oxidase é uma enzima associada a membrana que produz ânions superóxido por meio da transferencia de elétrons para o oxigênio molecular (Schäfer et al., 2008). Esta enzima tem sido exhaustivamente estudada, e

acredita-se que o excesso de superóxidos produzidos por ela contribua para a disfunção endotelial, e consequentemente para numerosas doenças cardiovasculares (Koupparis et al., 2005).

O aumento do estresse oxidativo no vaso, reduz a biodisponibilidade de NO, pois ocorre a degradação de NO pela reação com o superóxido, formando o radical peroxinitrito (NOOO<sup>-</sup>). Somado a isso, o estresse oxidativo pode converter a eNOS em uma enzima produtora de superóxido, processo este chamado de desacoplamento da eNOS (Förstermann & Sessa, 2012). Atualmente, tres mecanismos são implicados no desacoplamento desta enzima. O primeiro e mais conhecido mecanismo, é devido a oxidação do BH<sub>4</sub>, cofator essencial para a produção de NO pela enzima, e visto que este é extremamente sensível ao estresse oxidativo, ocorre uma diminuição de seus níveis em estados patológicos, levando a enzima a um estado desacoplado. O segundo mecanismo, é explicado pelo acúmulo de metilargininas endógenas, como a dimetilarginina assimétrica (ADMA), a qual é considerada como um fator de risco cardiovascular quando tem seus níveis aumentados. A dimetilarginina assimétrica é um inibidor endógeno da eNOS, e pesquisas mostram uma relação positiva entre seus níveis elevados, e o desacoplamento da eNOS. A produção e a degradação da ADMA é regulada pela Arginina N-Metiltransferase, e pela Arginina Dimetil-Amino- Hidrolase (DDAH), respectivamente. Em vários modelos de estresse oxidativo, é mostrado ocorrer um aumento da atividade da Arginina N-metiltransferase, e uma diminuição da atividade da Arginina Dimetil-Amino- Hidrolase, consequentemente, levando a um aumento das concentrações de ADMA, e ao desacoplamento da eNOS. O

terceiro mecanismo que explica o desaacoplamento da eNOS no estresse oxidativo, é a diminuição das concentrações de L-arginina (Förstermann & Sessa, 2012). Estes fenômenos levam ao aumento do estresse oxidativo, estado no qual há um desbalanço na produção de EROs que supera o sistema antioxidante endógeno. A Diminuição da catalase e/ou superóxido dismutase e redução dos níveis de 'sequestradores' de EROs como a glutathione e as vitaminas C e E que fazem parte do sistema antioxidante endógeno e exógeno também podem contribuir para o estresse oxidativo (Baradaran, et al., 2014). As EROs produzidas reagem rapidamente com o NO, aumentando a formação de peroxinitrito, e diminuindo a biodisponibilidade de NO.

Dados do presente trabalho fornecem evidências de que espécies reativas derivadas da NADPH Oxidase contribuem para o estresse oxidativo em animais apoE<sup>-/-</sup>, pois a apocinina, um inibidor específico da NADPH Oxidase reduziu a hiper-reatividade aórtica à FE observada em animais ApoE<sup>-/-</sup>, enquanto nos animais controle e sildenafil, a inibição da NADPH Oxidase não modificou a resposta vasoconstrictora. Tem sido mostrado que o aumento de GMPc pode inibir a expressão e a atividade da NADPH Oxidase, e consequentemente a produção de superóxido, desta forma aumentando a biodisponibilidade de NO. O resultado do presente estudo mostrando o efeito do sildenafil como antioxidante, estão de acordo com observações feitas em aortas de animais ateroscleróticos tratados com sildenafil marcadas com dihidroetídeo (DHE) (Balarini et al., 2013). Este achado corrobora com estudos prévios que mostram que a hipercolesterolemia aumenta a reatividade vascular por meio do estresse oxidativo, e diminui a sinalização NO/GMPc. Portanto,

terapias farmacológicas que potencializam esta sinalização podem ser efetivas em doenças cardiovasculares, principalmente aterosclerose. Neste contexto, o sildenafil surge como uma promissora alternativa, pois o mesmo evita a degradação do GMPc pela fosfodiesterase-5, além de possuir efeitos pleiotrópicos. Outros estudos tem mostrado que o sildenafil é capaz de promover upregulation da eNOS, da guanilato ciclase, aumentar BH4, e a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, e glutathione peroxidase, promovendo assim um aumento da biodisponibilidade de NO (Leal, et al., 2015)

Para confirmar o efeito antioxidante do sildenafil, nós avaliamos os níveis de peroxidação lipídica, e oxidação proteica no plasma dos animais experimentais TBARS e AOPP, respectivamente (Fig.11). Estes marcadores estão envolvidos na patofisiologia do estresse oxidativo e da inflamação, e o aumento de seus níveis tem sido associados a numerosas condições patológicas. Nossa hipótese da ação do sildenafil sobre as ERO's se confirmou mais uma vez, visto que os níveis de ambos marcadores de estresse oxidativo a nível sistêmico foram normalizados pelo sildenafil.

Por fim, observamos que o tratamento com sildenafil foi eficaz em reduzir a deposição de placa aterosclerótica no modelo murino apoE<sup>-/-</sup>. Houve redução de aproximadamente 40% da placa aterosclerótica da luz vascular nos animais tratados com sildenafil durante 3 semanas, acompanhada da melhora da função endotelial, redução da hipereatividade vasoconstrictora por diminuição do estresse oxidativo, e de prostanóides derivados das COX 1 e 2.

Dados recentes mostram que células endoteliais expostas a fluxo sanguíneo turbulento tem níveis elevados de RNAm de genes pro-aterogênicos (proinflamatório, proapoptótico e procoagulante), enquanto em regiões de fluxo laminar, tais células apresentam genes ateroprotetores (SOD1 e NOS). Balarini et al., (2013) mostrou por meio de cortes histológicos da aorta ascendente de camundongos ateroscleróticos, corado com Oil-red-O, que o sildenafil diminuiu em aproximadamente 40% a deposição lipídica em uma área de grande fluxo turbulento. Nós estendemos este estudo a áreas com baixo *shear stress*, pelo método *en face*, (Fig. 10) e observamos resultados semelhantes. Portanto, podemos inferir que os efeitos benéficos do sildenafil não são restritos a áreas específicas, mas se estendem a todos os segmentos da artéria. As propriedades antiaterogênicas do sildenafil podem ser explicadas pela atenuação do estresse oxidativo, e diminuição de cascatas inflamatórias, melhorando assim a função endotelial, como já foi demonstrado por nosso grupo (Balarini et al., 2013).

## **CONCLUSÃO**

## 8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados indicam que o tratamento crônico de animais ateroscleróticos ApoE<sup>-/-</sup> com sildenafil exerce efeitos protetores contra o aumento na vasoconstrição envolvendo mecanismos de sinalização NO/GMPc, e a melhora é acompanhada pela redução do estresse oxidativo, prostanoídes, e deposição lipídica vascular, de forma independente dos níveis de colesterol. Assim, acreditamos que o sildenafil possa ser uma interessante ferramenta para o tratamento da aterosclerose. Entretanto, investigações clínicas futuras são necessárias para confirmar a segurança desta abordagem farmacológica nestes pacientes, sobretudo naqueles que fazem uso de antianginosos doadores de óxido nítrico.



## **REFERÊNCIAS**

## 9. REFERÊNCIAS

Abrams. Sildenafil as a selective pulmonary vasodilator in childhood primary pulmonary hypertension. *Heart*. 2000 Aug;84(2):E4.

Arehart, et al. Acceleration of cardiovascular disease by a dysfunctional prostacyclin receptor mutation: potential implications for cyclooxygenase-2 inhibition. *Circ. Res.* (2008).102, 986–993,2008.

Bae, et al. Renoprotective effects of sildenafil in DOCA-salt hypertensive rats. *Kidney Blood Press Res.* p. 248-257,2012.

Balarini et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine*, v. 11, p. 3, Jan. 2013.

Bolisetty & Jaimes. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci.* 2013 Mar 19;14(3):6306-44

Boyle E.B.; *et al.* Atherosclerosis. *Ann Thorac Surg.*1997;64:47-56.

Camacho et al. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciênc Saúde.* Mar 2007.14;(1) :41-48.

Da Luz & Uint . Endotélio na Aterosclerose: Interações Celulares e Vasomotricidade. In: Da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. Endotélio e Doenças Cardiovasculares. São Paulo: Atheneu, 2003. Cap. 10, p. 133-160.

De Meyer & Herman. Vascular Endothelial Dysfunction. Progress in Cardiovascular Diseases.39(4):325–342.1997

D'Uscio et al . Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2001 Jun;21(6):1017-22.

Dussault et al. Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice.Hypertension. p.1043-9,Nov,2009.

Egan, et al.Cox-2- derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. Science 306, 1954–1957, 2004.

Fetalvero, et al. The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 290, H1337–H1346. 2006.

Filho & Zilberstein. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras. 2000;46(3):265-271.

Förstermann & Sessa . Nitric oxide synthases: regulation and function. European Heart Journal. 2012 Apr;33(7):829-37

Foresta et al. The PDE5 inhibitor sildenafil increases circulating endothelial progenitor cells and CXCR4 expression. J Sex Med.p 369-372, Feb, 2009.

Funk .Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. Science, 294:1871-1875; 2001.

Galaris & Pantopoulos. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. Crit Rev Clin Lab Sci. 2008;45(1):1-23.

Genest. Lipoprotein disorders and cardiovascular risk. J Inherit Metab Dis. 2003;26(2-3):267-87.

Glossmann, et al. Molecular mechanisms of the effects of sildenafil (VIAGRA). p. 305-18. Exp Gerontol. Jun, 1999.

Griendling, & FitzGerald. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. Circulation., 108: 1912-1916; 2003.

Gryglewski et al. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature.; 320:454-456, 1986.

Guimarães et al. Uso do Sildenafil em Pacientes com Doença Cardiovascular. Arq Bras Cardiol, São Paulo, volume 73, (nº 6), p. 515-520, 1999.

Hofker et al. (1998). Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. Atherosclerosis, 137(1): 1-11, 1998.

Iwatani et al. Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. Br J Pharmacol. 154(1):32-40. 2008.

Jawień et al. Mouse models of experimental atherosclerosis. J Physiol Pharmacol.; 55:503-517, 2004.

Kassim et al. Gene therapy for dyslipidemia: a review of gene replacement and gene inhibition strategies. Clin Lipidol . 2010 June ; 5(6).

Kolovou & Mavrogeni. Estrogen Receptor Activation, TNF- $\alpha$ , and Endothelial Dysfunction: Can We Keep Our Interest in Estrogens Awake? Angiology. 2014 Jan;65(1):9-11.

Lusis. Atherosclerosis. Nature. Lusis . Atherosclerosis. Nature. 2000 Sep 14;407(6801):233-41.

Madamanchi, et al. Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. J Thromb Haemost. 2005 Feb;3(2):254-67.

Meyrelles et al . Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. Lipids in Health and Disease. 2011 Nov 14;10:211.

Milani, et al. Reduction of diabetes-induced oxidative stress by phosphodiesterase inhibitors in rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.p.251-255, 2005.

MS, Ministério da Saúde. 2011. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha\\_plano.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/cartilha_plano.pdf) Acesso 20/01/2015

Navas-Acien et al. Metals in urine and peripheral arterial disease. Environ. Health Perspect.; 113:164 –169; 2005.

Plump et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343–353.

Prozialeck et al. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci.*, 79:1493–1506; 2006.

Quyyumi. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med.*;105:32S-39S, 1998.

Ross. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):801-9.

Saúde Brasil, Duncan, *et al.* Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. 2010.

SBC, Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2007. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Disponível em [http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/IV\\_diretriz\\_DA.asp](http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2007/IV_diretriz_DA.asp) Acesso 22/02/2015.

Scandalios. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res.*p.995-1014,Jul, 2005.

Smith, et al. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and-2. *J. Biol. Chem.*, 271: 33157–33160; 1996

STEGBAUER J. et al. Phosphodiesterase 5 attenuates the vasodilatory response in renovascular hypertension. *PLoS One*, v. 8, n.11, Jan., 2013.

Stocker & Keaney. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004 Oct;84(4):1381-478.

Valko. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* Jan;39:44–84. 2007.

Valko et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced câncer. *Chem. Biol. Interact.*,160: 140; 2006.

Wright et al. Prostanoid receptor: ontogeny and implications in vascular physiology. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 281: R1343 R1360; 2001.

Vanhoutte .Endothelial Dysfunction - The First Step Toward Coronary Arteriosclerosis. *Circulation Journal.*;73(4):595–601. 2009.

WHO,World Health Organization. 2011. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control.Disponívelem: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/atlas\\_cvd/en/Acesso](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/Acesso) 20/02/2015